



PROBIOL
PROGRAMA DE POSGRADO
EN BIOLOGÍA



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

Caracterización de la respuesta anatómica y efecto de la modulación de la temperatura sobre la resistencia al frío de *Vitis vinifera* durante la estación de dormición

Programa de doctorado PROBIOL
Universidad Nacional de Cuyo
2018

Autor:

Ing. Agr. Francisco Gonzalez Antivilo

Director:

Dr. Ing. Agr. Fidel Roig Juñent

Tutores:

Dr. Jorge Tognetti (CIC, Universidad Nacional de Mar del Plata)

Dr. Markus Keller (IAREC, Washington State University)

Palabras claves: vid, Malbec, fisiología vegetal, anatomía vegetal, Mendoza, heladas
invernales

ÍNDICES

ÍNDICE	A.2
ÍNDICE DE FIGURAS	A.8
ÍNDICE DE TABLAS	A.11
ABREVIATURAS	A.12
AGRADECIMIENTOS	B.1
PRÓLOGO	C.1
RESUMEN	D.2
OBJETIVOS	D.3
HIPÓTESIS	D.4
 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL Y MARCO TEÓRICO DE LA TESIS	 1.1
1.1. Descripción geográfica y agroclimática de la provincia de Mendoza	1.2
1.2. Relación de la provincia de Mendoza con la vitivinicultura	1.5
1.3. Marco teórico de la resistencia al frío en plantas perennes	1.7
1.3.1. Relación de la dormición y la resistencia al frío	1.7
1.3.2. Cambios físicos y químicos relacionados con la resistencia al frío	1.10
1.3.3. Etapas del proceso de resistencia al frío	1.13
1.3.4. Proceso de congelación y medición de muerte en los tejidos	1.15
1.3.5. Órganos y tejidos de estudio al evaluar la RF	1.18
	A.3

1.3.6. Factores intervinientes o modulantes de la RF	1.19
1.4. Principales fundamentos para la realización de esta tesis	1.21
CAPÍTULO 2: LAS CONDICIONES MACRO Y MICROCLIMÁTICAS PUEDEN ALTERAR LA DESACLIMATACIÓN DE LA VID: VARIACIÓN EN LA AMPLITUD TÉRMICA EN DOS REGIONES VITIVINÍCOLAS CONTRASTANTES DEL HEMISFERIO NORTE Y SUR	2.1
2.1. INTRODUCCIÓN	2.2
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	2.8
2.2.1. Condiciones de microclima en MZA y WA.	2.8
2.2.2. Comparación entre las mediciones de temperatura en campo y EMC	2.8
2.2.3. Condiciones microclimáticas de la planta	2.9
2.2.4. Efecto de la alta AT en la desaclimatación de brotes y diferentes tejidos de sarmientos	2.11
2.2.5. Análisis estadístico	2.14
2.3. RESULTADOS	2.15
2.3.1. Comparación de las condiciones macroclimáticas entre MZA y WA	2.15
2.3.2. Comparación entre las mediciones de temperatura a campo y las EMC	2.18
2.3.3. Condiciones microclimáticas de la planta	2.19
2.3.4. Efecto de la AT en las tasas de desaclimatación de yemas y distintos tejidos de caña	2.23
2.4. DISCUSIÓN	2.25
2.5. CONCLUSIONES	3.33
2.6. Anexo: Artículo publicado	2.35

CAPÍTULO 3: LOS PARÁMETROS DE LA HISTORIA TÉRMICA COMO MOTORES DE CAMBIOS EN LA FISIOLOGÍA Y RESISTENCIA AL FRÍO DE TRONCOS DE PLANTAS JÓVENES DE *VITIS VINIFERA* CV. MALBEC DURANTE EL INVIERNO

3.1. INTRODUCCIÓN

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Ensayo a campo.	3.8
Localización del ensayo y material vegetal	3.6
Diseño experimental	3.6
Fenología	3.8
Seguimiento térmico	3.8
Índices bioclimáticos	3.8
3.2.2. Laboratorio	3.9
Preparación de muestras	3.9
Simulación de helada y determinación del estado de RF	3.11
Análisis de almidón y azúcares totales no estructurados	3.14
Análisis de aminoácidos libres	3.14
Análisis de contenido de agua	3.14
Análisis estadístico	3.15

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Características térmicas de tratamientos N_w y AW_w	3.17
3.3.2. Índices ecológicos	3.22
3.3.3. Efecto de los ambientes térmicos sobre la fenología de <i>Vitis vinifera</i>	3.24
3.3.4. Resistencia al frío invernal de los tejidos del floema y xilema del tronco de vides	

Sometidas a diferentes ambientes térmicos	3.26
3.3.5. Mediciones fisiológicas en ambientes con diferente historia térmica	3.32
3.4. DISCUSIÓN	3.38
3.5. CONCLUSIONES	3.48

CAPÍTULO 4: UNA CONTRIBUCIÓN PRÁCTICA A LA VITICULTURA

ARGENTINA. NUEVAS EVIDENCIAS DE LAS CAUSAS DE LAS BROTACIONES

HETEROGÉNEAS AL RE-INICIO DEL CICLO VEGETATIVO:

EL SÍNDROME DOD	4.1
-----------------	-----

4.1. INTRODUCCIÓN

Climas continentales vs. marítimos: ¿Dos escuelas para los mismos síntomas o afecciones diferentes.	4.3
---	-----

El rol clave del cambium en la reactivación de un nuevo ciclo vegetativo en la vid	4.6
--	-----

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Evolución de la brotación, seguimiento fenológico y consecuencias anatómicas en estacas uninodales de V. vinifera cv. Malbec luego de sometidas a distinta severidad de heladas simuladas.	4.12
---	------

4.2.2. Evaluación del momento del comienzo de la actividad cambial y comparación con el avance del ciclo vegetativo de V. vinifera cv. Malbec	4.17
---	------

4.2.3. Evaluación de la respuesta vegetativa y productiva en plantas afectadas por daños en floema en distinta magnitud	4.18
---	------

4.2.4. Recuento de eriófidos en yemas no brotadas de V. vinifera cv. Malbec	4.19
---	------

4.2.5. Mínimas absolutas en 4 oasis de la provincia de Mendoza durante el invierno	4.19
--	------

4.2.6. Análisis estadístico	4.20
-----------------------------	------

4.3. RESULTADOS	4.20
4.3.1. Evolución de la brotación, seguimiento fenológico y consecuencias anatómicas en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec luego de sometidas a distinta severidad de heladas simuladas	4.20
4.3.2. Evaluación del momento del comienzo de la actividad cambial bajo condiciones de campo y comparación con el avance del ciclo vegetativo de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec	4.26
4.3.3. Evaluación de la respuesta vegetativa y productiva en vides bajo condiciones de campo afectadas y no afectadas por daños en el floema como consecuencias de una helada invernal	4.27
4.3.4. Recuento de eriófidos en yemas no brotadas de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec	4.30
4.3.5. Mínimas absolutas en 4 oasis de la provincia de Mendoza durante el invierno	4.32
4.4. DISCUSIÓN	4.34
4.5. CONCLUSIONES	4.43
4.6. ANEXOS	4.44
4.6.1. Anexo 1: Evolución de la brotación en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Merlot sometidas a heladas de distinta severidad	4.44
4.6.2. Anexo 2: Análisis fitopatológicos en yemas no brotadas de vid	4.46
4.6.3. Anexo 3: Estados fenológicos de la vid según Bagliolini (1952)	4.47
4.6.4. Anexo 4: Síntomas causados por eriófidos en <i>Vitis vinifera</i>	4.48
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	5.1
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	E.1

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Ubicación de la República Argentina	1.3
Figura 1.2. El cultivo de la vid en diferentes regiones agroclimáticas del mundo.	1.7
Figura 1.3. El cultivo de la vid en diferentes regiones agroclimáticas del mundo.	1.7
Figura 1.4. Comparación de la temperatura media diaria, endodormición Y resistencia al frío (RF) en yemas de vid.	1.9
Figura 1.5. Dinámica de los cambios de los carbohidratos de las sarmientos en vid durante el invierno.	1.12
Figura 1.6. Tejidos sanos y dañados por frío en sarmientos y yemas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec.	1.17
Figura 1.7. Daños en yemas y sarmientos de diferentes cultivares de vid en Oregon seguidos de fuertes heladas en los años 1972, 1989 Y 1990.	1.20

Capítulo 2

Figura 2.1. Meta-análisis de 100 publicaciones sobre resistencia a frío en plantas frutales de todo el mundo según países y décadas.	2.5
Figura 2.2. Caracterización del microclima de vid durante la temporada de dormición en Mendoza y Washington	2.10
Figura 2.3. Perfiles típicos de DTA de exotermas de baja temperatura (LTE), indicando congelación intracelular letal	2.13
Figura 2.4. Diez años de registros macroclimáticos (2002-2012).	2.16
Figura 2.5. Comparación de la variación mesoclimática entre las condiciones de campo y la estación meteorológica convencional en MZA y WA.	2.18
Figura 2.6. Caracterización microclimática de un día promedio de las temperaturas internas y externas de los troncos de vid durante la ED.	2.22
Figura 2.7. Temperaturas letales (LT10) en yemas de vid y tejidos e caña después de diferentes tratamientos térmicos antes de una simulación de congelación en cv. Chardonnay y cv. Merlot.	2.23

Capítulo 3

Figura 3.1. División en secciones de plantas de dos años de <i>Vitis vinifera</i> .	3.10
Figura 3.2. Esquema de metodología de muestreo	3.12
Figura 3.3. Comparación de los días promedio de los diferentes ambientes evaluados.	3.18
Figura 3.4. Comparación de tres años diferentes de temperaturas de invierno y su impacto en la resistencia al frío en <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec.	3.20

Figura 3.5. Oasis productivos en Mendoza e índices ecológicos.	3.22
Figura 3.6. Etapas fenológicas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec sometidas a dos ambientes térmicos contrastantes.	3.24
Figura 3.7. Evolución de la resistencia al frío en floema durante la temporada de invierno en campo (NW) y en condiciones artificiales (AWW).	3.27
Figura 3.8. Evolución de la resistencia al frío en xilema durante la temporada de invierno en campo (NW) y en condiciones artificiales (AWW).	3.29
Figura 3.9. Influencia del ambiente térmico sobre la resistencia al frío de los tejidos del floema y xilema del tronco de la vid.	3.31
Figura 3.10. Evolución del contenido de AzST en troncos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec sometidas a dos ambientes térmicos diferentes durante el invierno de 3 años, 2012, 2013 y 2016.	3.33
Figura 3.11. Evolución del contenido de AmLT en troncos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec sometidas a dos ambientes térmicos diferentes durante el invierno del 2016.	3.35
Figura 3.12. Análisis de componentes principales de variables térmicas, fisiológicas y bioquímicas involucradas en la resistencia al frío de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec a lo largo de tres años.	3.37
Capítulo 4	
Figura 4.1. Sintomatología y daños encontrados en vides de la provincia de Mendoza	4.3
Figura 4.2. Anatomía de una caña de vid de 1 año de edad durante la época de dormición	4.7
Figura 4.3. Diagrama ilustrando los cambios estacionales del floema en una caña de vid	4.9
Figura 4.4. Sección transversal esquemática desde la estación de dormición hasta el desarrollo de células radiales de xilema y floema para una especie arbórea de hoja caduca	4.10
Figura 4.5. Esquema de la metodología aplicada en el apartado 4.2.1	4.14
Figura 4.6. Distintas fases de la actividad del cambium entre la etapa de dormición y ciclo vegetativo	4.15
Figura 4.7. Integridad celular del floema en estacas uninodales de Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas	4.17
Figura 4.8. Evolución de la brotación en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas	4.22
Figura 4.9. Evolución de la fenología en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas al día 15 desde iniciado en ensayo	4.23

Figura 4.10. Evolución de la actividad cambial en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas	4.25
Figura 4.11. Evolución de la integridad celular en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas	4.26
Figura 4.12. Evolución de la actividad cambial durante el final de la estación de dormición y el comienzo del ciclo vegetativo en plantas de <i>V. vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes severidad de heladas implantadas a campo en la estación experimental de la FCA, Luján de Cuyo, Mendoza	4.27
Figura 4.13. Evolución de la brotación en estacas uninodales de <i>V. vinifera</i> cv. Merlot sometidas a diferentes severidad de heladas	4.45
Figura 4.14. Estados fenológicos de la vid según Bagliolini (1952)	4.47
Figura 4.15. Síntomas causados por eriófidos en <i>Vitis vinifera</i>	4.48

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Comparación de las condiciones climáticas y geográficas entre MZA y WA	2.6
Tabla 2.2. Caracterización del microclima de plantas en MZA y WA durante la ED.	2.20
Tabla 2.3. Diferencia media entre LT1030°C y LT10Control.	2.23

Capítulo 3

Tabla 3.1. Comparación de parámetros térmicos durante la temporada de invierno entre dos ambientes térmicos contrastantes: NW y AWW	3.17
Tabla 3.2. Fecha de comienzo de brotación de plantas de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec sometidas a diferentes ambientes térmicos	3.24
Tabla 3.3. TL50 en floema y xilema de troncos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec durante la temporada de invierno en dos ambientes térmicos contrastantes (NW y AWW) de tres años de medición (2012, 2013 y 2016).	3.27
Tabla 3.4. Análisis de correlación entre el CA y la RF en troncos de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec en xilema y floema.	3.33

Capítulo 4

Tabla 4.1. Comparación del vigor de las plantas afectadas por una helada y con daños en floema (Floema Dañado) contra plantas sin daño en floema (Testigo) al finalizar el ciclo vegetativo.	4.28
Tabla 4.2. Comparación de la producción de plantas afectadas por daños en floema (Floema Dañado) contra plantas sin daño en floema (Testigo) al finalizar el ciclo vegetativo.	4.30
Tabla 4.3. Recuento de eriófidos en yemas de Malbec no brotadas.	4.31
Tabla 4.4. Temperaturas mínimas absolutas durante el invierno en 4 oasis productivos de la provincia de Mendoza durante el periodo 2007 al 2017.	4.33
Tabla 4.5. Probabilidad porcentual de daño en floema de <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec por helada para 4 oasis productivos de Mendoza en el periodo 2007-2017	4.34

ABREVIATURAS

A-1, A-2 y A-3: Años 1, 2 y 3 correspondientes a los años 2012, 2013 y 2016 respectivamente

AmLT: Aminoácidos Libres Totales

AT: Amplitud Térmica

AW_w: Invierno Artificialmente Cálido (del Inglés, Artificial Warm Winter)

AzST: Azúcares Solubles Totales

CA: Contenido de agua

DACC: Dirección de Contingencias Climáticas de la provincial de Mendoza

DTA: Análisis Térmico Diferencial (del inglés, Differential Thermal Analysis)

EC: Estación de Crecimiento

ED: Estación de Dormición

EMC: Estación Meteorológica Convencional

GAP: Fenómeno de la Detención del Crecimiento (del inglés, Growth Arrestment Phenomenon)

HN: Hemisferio Norte

HS: Hemisferio Sur

Mb: Malbec

MZA: Mendoza

N_w: Invierno Natural (del inglés, Natural Winter)

PFM: Proporción de Floema Muerto

RF: Resistencia o Robustez al frío

RSd: Enfermedad del Crecimiento Restringido de Primavera (del inglés, Restricted Spring Disease)

RSG: Crecimiento Deficiente en Primavera (del inglés, Restricted Spring Growht)

SSS: Síndrome del Crecimiento Corto del Brote (del inglés, Short Shoot Syndrome)

TL₁₀: Temperatura Letal donde se muere el 10 % de los tejidos

TL₅₀: Temperatura Letal donde se muere el 50 % de los tejidos

TL_{50-F}: Temperatura Letal donde se muere el 50 % del tejido floemático

TL_{50-X}: Temperatura Letal donde se muere el 50 % del tejido xilemático

Tmax: Temperatura máxima

Tmedia: Temperatura media

Tmin: Temperatura mínima

WA: Washington State

Agradecimientos

Al llegar esta etapa a su fin es momento de agradecer a todos los implicados, sin embargo, no es una tarea fácil ya que fueron muchos años los recorridos. Infinidad de personas e instituciones han ayudado de alguna manera u otra en la generación de esta información y en mi formación técnica-científica, así que intentaré ser lo más memorioso posible.

El comienzo de este camino fue en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, casa que me cobijó, por lo que agradezco sinceramente a mis compañeros de laboratorio, a los que participaron de mi vida laboral y personal. Pero quiero hacer una mención especial a quien fue mi director inicialmente, Roberto Borgo. También a compañeros que participaron de charlas técnicas y compartieron equipamiento de sus proyectos conmigo, como fueron Bruno Cavagnaro, Emiliano Malovini, Liliana Martínez y Leonor Deis. De la Facultad también quiero agradecer a Luis Emily por apoyarme y permitirme obtener material vegetal de las parcelas de la institución.

En esa etapa también fue fundamental el apoyo que recibí del Instituto de Biología Agrícola Mendoza (IBAM y la Cátedra de Química Biológica y su personal). Rubén Bottini, Patricia Piccoli, Federico Berli, Leonardo Bolcatto, Maria Victoria Salomón, y resto del equipo, a los cuales les estoy agradecido por su colaboración.

Aportando ideas e equipamiento también participaron los integrantes del laboratorio de Fisiología Vegetal de EEA INTA Mendoza. Jorge Perez Peña, Eugenia Galat Giorgi, Jorge Prieto, Hernán Vila y Dante Gamboa.

Fue fundamental para llegar a mejores conclusiones el soporte estadístico que dio la Cátedra de Estadística de la Universidad Nacional de Córdoba a través de Mónica Balzarini y Mariano Córdoba.

En cuanto a mediciones químicas-biológicas participaron compartiendo su información y su tiempo personal del INTA Alto Valle como Verónica De Angelis, Dolores Raffo, Vanesa Asencio y Andrea Rodriguez. También sumo a los agradecimientos a Mariela Echeverría, del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales de la Universidad Nacional de Buenos Aires, ya que gracias a ella se completó una etapa fundamental de los análisis bioquímicos.

Del INTA EEA Junín tuvo una intensa participación Javier Chaar, quien compartió experiencias, conocimientos y con quién fundamos un foro de “Resistencia al frío en plantas perennes” con funcionamiento mensual.

También tuvieron un rol protagónico los compañeros de la segunda etapa de mi doctorado en IANIGLA-CCT Mendoza. Un agradecimiento especial Federico González, quien fabricó parte del equipamiento necesario para mediciones ambientales. Silvina Lassa y Eduardo “Quique” Barrio fueron fundamentales en la preparación del material, y las mediciones en cortes anatómicos, además de brindar su calidez y compañerismo.

También quiero agradecer a Nadia Arias por el compartir de experiencias relacionadas a la temática y ser guía de muchas ideas nuevas.

Parte del equipamiento, recursos e instalaciones fundamentales para que esta tesis llegue a su fin fue aportado por Floralis lab. También tengo que agradecer a Vivero Mercier S.A por aportar el material vegetal para la tesis.

Al personal administrativo, directivo y cuerpo docente del programa de doctorado PROBIOL por su soporte a mis dudas y hacer esto posible.

Mis tutores, Markus Keller y Jorge Tognetti, tuvieron un rol protagónico en la discusión de ideas, aporte de experiencias, soporte técnico y revisión de los artículos científicos y este manuscrito. Ambos tutores me recibieron en sus laboratorios tanto de IAREC de

Washington State (WA, EEUU) como en el CIC de Balcarce (Unidad integrada INTA-UNMdP). En el IAREC pasé 3 meses aprendiendo técnicas de medición de resistencia al frío que no se utilizaban en nuestro país. De este aprendizaje participaron Jhon Ferguson y Lynn Mills.

También dejaron su huella en esta tesis alumnos-pasantes de la cátedra de fisiología vegetal que me ayudaron en tareas operacionales y de gabinete a través de los distintos años. A riesgo de olvidarme de alguno, los nombraré a continuación: Marianela Bustos, Maria Hilen Pareja, Brunela Suriano, Victoria Munafó, Enzo Fernandez, Fernanda Diez de Borbón, Rosario Toso, Silvina Barufaldi, Luisa Amoretti, Emiliano Carrizo, Florencia Brucculo, Emilia Di Marco, Florencia Cruz, Lucia Espinosa.

Un agradecimiento especial a Fidel Roig, por dirigir la segunda parte de mi doctorado, brindar, contención, soporte técnico, recursos y confianza. Sin su participación clave dudosamente estaría llegando este momento.

Ahora se me hace necesario dar crédito y recordar al soporte emocional de esta tesis. Personas que fueron muy importantes en otras etapas de mi vida y que son parte de este doctorado también, Marcela y familia. Amigos que dieron cobijo en sus casas cuando viajé a los diversos institutos de investigación.

Por supuesto a mi familia natal, que sin ellos nada de esto sería posible, mis padres Francisco y Cecilia y mi hermana Alejandra. Gracias a su cariño y al soporte que han dado durante toda mi vida es que he podido formarme académicamente y en estos momentos cerrando una instancia más de crecimiento profesional.

Y para cerrar este extenso listado de agradecimientos, uno muy especial a mi compañera y esposa, Rosalia, que me quiere y soporta en el día a día. Además de su

contención emocional en los altos y bajos de la carrera por alcanzar este título, ella inspira mi más alto respeto intelectual. Con su amorosa dedicación ha estado sentada junto a mi, discutiendo, elaborando y ensayando muchas de las ideas y conclusiones de este doctorado. Por supuesto un extensivo agradecimiento a la familia Paz, Jorge, Ruth, Luis y Paula, que también me han apoyado y han sido parte de esta tesis.

A todos ustedes más que agradecidos por permitirme avanzar en esta pasión que es el conocimiento. Los quiero.

Esta tesis fue financiada gracias al apoyo en primera instancia del programa PRH financiado por la Universidad Nacional de Cuyo y la Agencia de promoción científica y técnica. Luego, en una segunda etapa, la finalización de este doctorado a sido financiado por CONICET. Gracias al personal de estas instituciones.

Prólogo

Breve presentación del tesista doctoral

Mi nombre es Francisco Gonzalez Antivilo, 37 años, mendocino. Egresé del bachillerato como técnico agrónomo y enólogo, para luego cursar los estudios universitarios en la carrera de ingeniería agronómica en la Universidad Nacional de Cuyo, la cual finalicé en el año 2006.

Comencé mi carrera laboral asesorando a productores vitícolas a través de diversos programas de vinculación entre INTA y la COVIAR (Corporación Vitivinícola Argentina) además de otras actividades relacionadas al sector.

Mis 5 primeros años de carrera laboral los dediqué a estas actividades. Así, un día, asesorando encontré plantas muertas, colapsadas, de las cuales no pude hacer ningún diagnóstico. Llevé muestras a distintos institutos de investigación de la provincia y no encontré respuestas tampoco. Entre los colegas más experimentados surgió la posibilidad de que se debiese al “RSG”, un síndrome (conjunto de síntomas) que nadie había estudiado en el país. Corría el año 2010.

Por aquel entonces estaba cursando la maestría de Viticultura y Enología en la misma facultad que me formó en el grado universitario. Mi tema de tesis estaba vinculado a las reservas en las vides y la evolución de la sustentabilidad del cultivo relacionado a la práctica del deshoje. Sin embargo, un día me topé con la posibilidad de postular a una beca doctoral co-financiada entre la Universidad y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. Sin saber exactamente de qué se trataba un doctorado me postulé a la beca y se me otorgó. Así que, desistí de la maestría (la cual ya estaba avanzada), para comenzar el doctorado. Como tema de estudio elegí retomar ese viejo problema al cual no había podido dar respuesta, que eran esas plantas muertas de manera súbita cuya sintomatología parecía no estar relacionada a ningún patógeno. Sin embargo, con algunos fundamentos técnicos e intuición, ya empezaba a inclinarme por que los daños podrían deberse a heladas invernales.

Al tomar un curso de fisiología de la vid con un profesor suizo-estadounidense llamado Markus Keller, me comentó que él había visto síntomas de daño por frío en Mendoza pero que le parecía

extraño porque en su zona de trabajo (Washington, EEUU) el daño sucedía a temperaturas mucho menores. Así, se empezó a gestar esta tesis: dos zonas diferentes, dos inviernos distintos, los mismos daños.

Para un ingeniero técnico dedicado al área de la producción, el doctorado no fue un camino fácil, en principio por una cuestión de formación, pero también por los tiempos que conllevan las demostraciones científicas. De hecho, pasé gran parte del doctorado buscando recursos, información y equipamiento para realizar la tesis.

Cuando ya planteé la fuerte hipótesis de que las muertes que se veían a campo se debían a que ciertas plantas, en ciertos años, no resistían las condiciones del invierno (especialmente agosto), me encontré con una limitante fundamental: la escasa información sobre la temática en nuestras condiciones ambientales debida a la ausencia absoluta de investigadores/técnicos dedicados a la misma. Tampoco encontré el equipamiento necesario para simular heladas, algo básico para el estudio. Lo primero que pude solucionar fue la parte técnica debido a que Markus Keller me invitó a trabajar con él en su laboratorio del IAREC (en Washington, EEUU). Allí, al menos, pude formar las ideas de qué medir y cómo hacerlo. Me quedaba el desafío de poder realizarlo en Mendoza, y sin demasiados recursos.

La cuestión es que varios años después puedo dar cuenta que salí airoso de las múltiples dificultades y me encuentro presentado mi tesis doctoral al programa de doctorado Probiol de la Universidad Nacional de Cuyo (cat A).

Para resumir, estoy muy contento de haber generado mi granito de arena a la viticultura del país, más en una temática que estaba “congelada” y que no tenía avances recientes. No es una tesis de ciencia básica, sino más bien una aplicada con ribetes de ciencia básica.

Problemática encontrada, problemática estudiada

La vid se cultiva casi exclusivamente en la zona cordillerana del país con un alto índice de continentalidad, lo que significa que hay una extensa brecha entre las temperaturas máximas y mínimas (propio del desierto como son Mendoza y San Juan). Dependiendo del año, la intensidad de las heladas son más o menos fuertes, por lo que no siempre generan daños, ni tampoco son tan extensos como para comprometer la sustentabilidad de estas provincias como región vitícola. Sin embargo si se pueden encontrar graves daños a nivel predial.

Hay daños que son los “obvios” ya que al suceder durante la estación de crecimiento de la planta son fáciles de reconocer. En estos casos los daños ocurren sobre brotes e inflorescencias debido a las llamadas heladas tardías. Sin embargo, también es otro tema de importancia agronómica sobre la cual hay escasa información.

Pero también suceden daños menos obvios, que son los que yo llamo “ocultos”, o como más adelante propongo llamar Daños Ocultos de la Dormición o simplemente DOD. Estos daños suceden en la madera, específicamente en el floema, y que se evidencian recién al reiniciarse el ciclo vegetativo. Se podría decir que, en la escala de severidad, las peores consecuencias están relacionadas a la muerte de la planta, y que en el mejor de los casos vuelve a rebrotar desde la zona del cuello de la planta. En estos casos hay que reformar la planta o directamente plantar una nueva. Estos daños son más frecuentes en plantaciones jóvenes por lo que en determinadas zonas, esta problemática puede perjudicar grandemente al establecimiento de un viñedo rentable. Solo por compartir una breve experiencia personal a modo de ejemplo, puedo decir que he visitado fincas que llevan 5 años de plantación y no han podido cosechar ni un grano de uva; es más, todavía, no pueden terminar de formar las plantas.

Los daños menos severos incluyen brotaciones heterogéneas, pobre área foliar, poca y mala producción de uva. Si bien estos síntomas también son un problema, tienen un impacto sobre el año en curso, y no en la sustentabilidad del viñedo.

Sean daños severos o moderados el impacto en la economía de la propiedad vitícola afectada es alto porque les acarrea mayores costos de producción y menor calidad de uva, lo que se traduce en una menor rentabilidad.

¿Por qué no se pensó en el frío invernal como una problemática? En mi tesis he demostrado la divergencia enorme que puede haber entre la temperatura de una casilla meteorológica convencional y un sensor dispuesto en el cuello de la planta (ahí suceden los daños principalmente). Dependiendo de muchas situaciones, las diferencias pueden llegar a los 5 °C.

Pero por otro lado no existían mediciones locales de la temperatura de resistencia de la vid. Se extrapolaban temperaturas de resistencia de EEUU donde los inviernos son completamente distintos a los nuestros. Allá son húmedos, con baja amplitud térmica, con temperaturas extremas muy bajas. Mientras que acá son secos, con una altísima amplitud térmica (especialmente si corre viento Zonda) y con temperaturas extremas muy bajas solo ciertos años (en el 2011, 2015 y 2017 se registraron -15 °C en algunas zonas de Mendoza a nivel de casilla meteorológica).

La confusión y la falta de información seguramente llevó a desestimar al frío invernal como un agente causal de daños.

Las plantas de vid tienen la capacidad de sensar las temperaturas y ajustar los mecanismos fisiológicos para resistir las condiciones invernales. Según esta tesis, dependiendo de las condiciones ambientales a las cuales están sometidas las plantas, será el grado de resistencia al frío. Así una planta expuesta a condiciones más cálidas tiene una menor resistencia que otra en

temperaturas más frías. Al momento de ocurrencia de una helada ésta historia térmica previa determina la supervivencia o no de la planta.

¿Como quedó organizada esta tesis? En 4 capítulos que describo a continuación:

Capítulo 1: corresponde a una introducción general que pretende dejar planteados conceptos teóricos básicos de la temática.

Capítulo 2: demuestra que las condiciones macroclimáticas de la estación de dormición pueden alterar la resistencia al frío de las plantas de vid. Y que además las mediciones térmicas entre casillas meteorológicas convencionales y sensores cercanos a las plantas pueden variar fuertemente, por lo cual para conocer la realidad del cultivo es necesario contar con información “in situ”.

Capítulo 3: demuestra como la historia térmica puede modular, por un lado, la resistencia al frío, pero también a diferentes compuestos que tienen la capacidad de proteger a las células por un proceso llamado “sobre-enfriamiento”, en un mismo clon de la variedad Malbec (clon Perdriel).

Capítulo 4: es un capítulo relacionado a la anatomía con el fin de demostrar que los daños en floema de los troncos de vid están asociados con los síntomas que se observan a campo. Por ejemplo, falta de brotaciones o brotaciones atrasadas.

Resumen

Objetivos

Hipótesis

Resumen

El frío es una de las contingencias climáticas que más afecta la sustentabilidad, cantidad y calidad de producción de frutales perennes. *Vitis vinifera* es una planta adaptada al frío invernal, sin embargo la resistencia a las bajas temperaturas está modulada por las características agroclimáticas. Cuando las temperaturas invernales son inferiores al umbral de resistencia, pueden ocurrir daños causando muerte de plantas, deficiencias de brotación, desbalances y pérdidas en la producción. Pese a que en distintas variedades de vid cultivadas en Mendoza se han observado los síntomas descriptos para daños por frío, la temática no ha sido suficientemente estudiada. Es por ello que esta tesis pretende dilucidar cómo los factores bióticos/abióticos modulan la resistencia al frío en vid durante la estación de la dormición. Así, se logró determinar que las condiciones climáticas de Mendoza tales como el alto índice de continentalidad, baja humedad relativa y alta frecuencia de vientos Zonda favorecen la pérdida de resistencia al frío. Por otra parte, se profundizó sobre la fisiología de la resistencia sometiendo plantas de un mismo clon a dos condiciones térmicas diferentes y evaluando el nivel de resistencia alcanzado en cada caso, además de la cuantificación de diferentes variables bioquímicas. Este estudio permitió determinar que las temperaturas mínimas previas definen los umbrales de resistencia, y que los azúcares juegan un rol protagónico en este proceso. Finalmente, se determinó cómo la severidad de una helada afecta los diferentes tejidos de los sarmientos. Así, se observó que el floema es el tejido más susceptible con daños graduales según la severidad de una helada. Finalmente se cuantificó la merma en el vigor y en la producción de plantas en condiciones de campo

con daño en floema. Esta tesis representa un trabajo inédito en el país y sus resultados arrojan luz sobre un síndrome no diagnosticado hasta el momento.

Objetivos

- 1- Analizar las variables ambientales tales como temperatura media, temperatura máxima, temperatura mínima y amplitud térmica a fin de establecer cual de estos factores tiene mayor influencia sobre la resistencia al frío en la vid.
- 2- Determinar si las alternancias térmicas diarias pueden influir en la pérdida de resistencia al frío en troncos y sarmientos de vid.
- 3- Obtener valores de temperaturas de resistencia al frío para los distintos tejidos de troncos y sarmientos de vid (floema y xilema) en la provincia de Mendoza.
- 4- Cuantificar las diferencias en términos de resistencia al frío en vides de un mismo clon mantenidos durante la estación de dormición en dos ambientes térmicos diferentes.
- 5- Determinar la importancia relativa de diferentes componentes bioquímicos (azúcares libres totales, aminoácidos libres totales, contenido de agua, proteínas y almidón) en el mecanismo fisiológico de resistencia al frío en tejidos invernantes de vid.
- 6- Determinar cómo los daños en el tejido floemático pueden afectar a la brotación de las yemas de vid al reinicio del ciclo vegetativo.
- 7- Cuantificar el efecto sobre el vigor y productividad mediante el análisis de los componentes de la producción en vides afectadas por daños en floema del tronco durante la estación de dormición.

Hipótesis

1- Las temperaturas máximas diarias determinan el proceso de desaclimatación de los diferentes tejidos de los troncos y sarmientos de la vid.

3- Las temperaturas de resistencia al frío en troncos y sarmientos de vid en zonas de alta amplitud térmica, como la provincia de Mendoza, son menores a las informados para zonas de baja amplitud térmica durante la estación de dormición.

4- La historia térmica a las cuales están sometidas las vides de un mismo clon durante la estación de dormición modula la resistencia al frío en troncos, siendo menos resistentes las del ambiente más cálido.

5- Los azúcares solubles totales son más influyentes en la resistencia al frío que el contenido de agua y los aminoácidos totales.

6- Daños en el tejido floemático de los troncos y sarmientos de vid durante la estación de dormición afecta la brotación debido a un desabastecimiento energético, siendo más severas las consecuencias mientras más tejido floemático se dañe.

7- La sintomatología no diagnosticada a campo que se ha observado en la provincia de Mendoza como son las brotaciones desparejas, atrasadas, con brotes poco vigorosos, pérdida de rendimientos en términos de kg de uva y rebrotes desde el cuello de la planta y que se registran al reinicio del ciclo vegetativo, se corresponden con daños en el floema causado por heladas durante la estación de dormición.

Capítulo 1

Introducción general y marco teórico de la tesis

1.1. Descripción geográfica y agroclimática de la provincia de Mendoza, Argentina

La Argentina es el 8° país con más extensión territorial del globo terráqueo y se encuentra en el extremo sur del continente americano. La disposición y la extensión determinan diferentes latitudes, lo que conllevan diversas situaciones agroclimáticas. El oeste del país se encuentra bordeado por la Cordillera de Los Andes (Figura 1.1A). La provincia de Mendoza, con una superficie total de la provincia es de 148.827 km² y una población de 1.741.610 habitantes (4° más poblada del país), se encuentra al centro oeste del territorio de la República Argentina (Figura 1.1B) (INDEC 2010).

La provincia se encuentra ubicada entre los 32 ° y 38 ° de latitud sur y entre los 66 ° 30' y los 70° 30' de longitud oeste, cercada hacia el oeste por la porción de la Cordillera de los Andes más alta, con altitudes oscilan los 5000 a 6000 msnm. Al este de la cordillera se encuentra una planicie donde se han desarrollado las actividades humanas.

La altura y ancho de la cordillera la conforman como una barrera climática que determina que los húmedos vientos invernales provenientes del Océano Pacífico, al elevarse por efecto de la orografía, generen precipitaciones en forma de lluvias o nieve. El viento que pasa la cordillera, ya seco, comienza un proceso de calentamiento que da lugar al viento llamado Zonda (Norte y Simonelli 2016; Caretta et al. 2014).

En este territorio las precipitaciones estivales son escasas y torrenciales con un promedio anual de cerca de los 200 mm, lo que determinan un clima semidesértico, templado, continental y seco, con grandes oscilaciones térmicas a lo largo del año. La temperatura media para enero (verano) es de 24 °C, mientras la temperatura media para julio es de 6 °C (Climatic-data.org 2017).

Figura 1.1. A) Ubicación de la República Argentina en el mapa planisferio (marcada en color azul). B) Mapa de división política de la República Argentina donde se encuentra marcada la provincia de Mendoza (color rojo), zona de estudio.



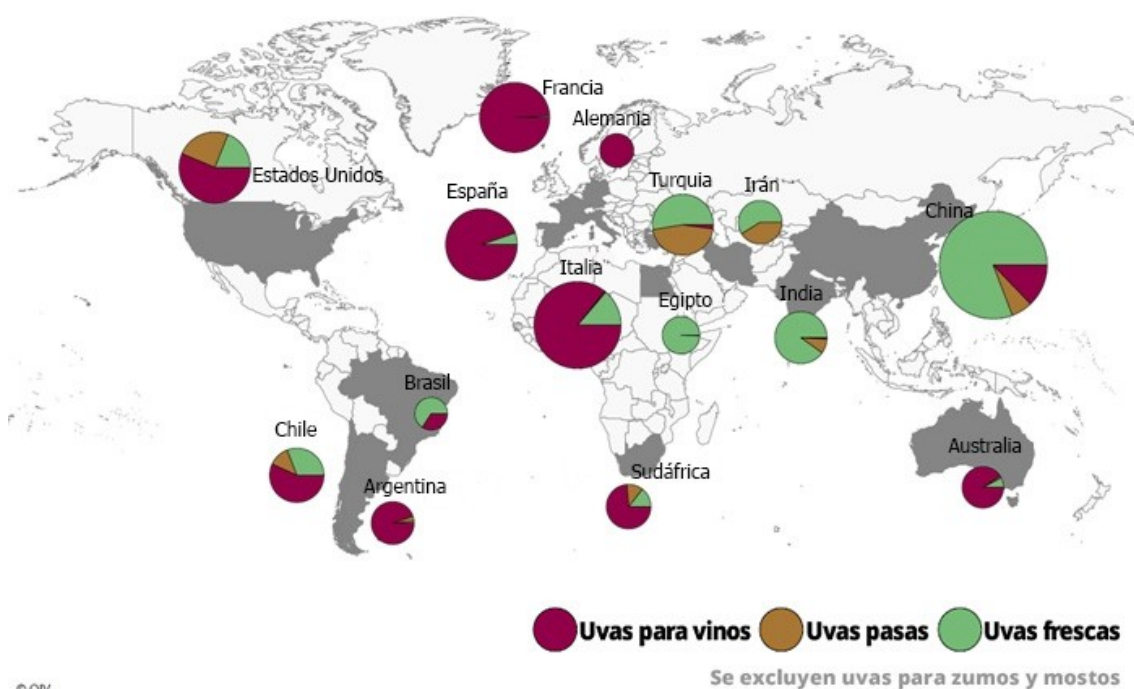
Ante la escasez de precipitaciones el sistema agrícola se basa en el regadío de los cultivos mediante canales y acequias. El agua proviene de los glaciares y nieve que se derriten en primavera y que es colectada por un sistema de diques con el que cuenta la provincia. Así mismo existe un organizado sistema de distribución del agua, tanto sea para usos domiciliarios, industriales o agrícolas. La disponibilidad de agua restringe el uso de la tierra para fines agrícolas. De este modo, la producción agrícola se concentra alrededor de los ríos de deshielo que han conformado cuatro oasis dados a llamar: Norte, Centro (o más bien conocido como Valle de Uco), Este y Sur. Se estima que solo

el 4,2 % de la superficie total de la provincia es cultivada, lo que corresponde a aproximadamente 300 mil ha (Instituto Nacional del Agua, INA).

Por otra parte, las condiciones orográficas particulares y la lejanía al mar determinan que la provincia posea una elevada heliofanía e irradiación solar, que es contraproducente por la alta tasa evapotranspiratoria de los cultivos, pero que beneficia al sistema agrícola con la baja incidencia de hongos y otros patógenos.

A pesar de todo la Argentina es el 5 ° productor de uva para uva del mundo y el 1° productor de vino de latinoamérica (OIV 2016, www.vinetur.com, Figura 1.2).

Figura 1.2. Mayores productores de uva según destino de la producción a nivel mundial. Se marcan en gris las zonas productoras (latitudes 20° y 45°).



1.2. Relación de la provincia de Mendoza con la vitivinicultura

La historia de la vid en la provincia de Mendoza data de alrededor de 500 años atrás, favorecido por su posición geográfica y demás características comentadas anteriormente. *Vitis vinifera* es una planta trepadora perenne de clima templado originaria de Asia. Las mayores zonas productoras del mundo se encuentran en regiones de “4 estaciones” bien marcadas, cosa que se da entre las latitudes 20° y 45 ° del globo (Figura 1.2).

El crecimiento como zona productiva también se vio favorecido a partir del 1850 ya se comenzó a evaluar el comportamiento agrícola de distintas variedades de origen francés e italiano que fueron importadas a la provincia. Así la provincia, con el tiempo, se convirtió en polo productivo e industrial. Hoy en día Mendoza cuenta con el 78 % de la superficie implantada con *Vitis vinifera* a nivel nacional (INV 2016), lo que se corresponde con aproximadamente 160 mil ha, convirtiéndola en una de las regiones de mayor importancia vitícola del hemisferio sur. Es decir que el 50 % de la superficie agrícola de la provincia está destinada a este cultivo, lo que demuestra la importancia local de la vid (INV 2016).

La provincia cuenta con un amplia gama de variedades blancas, rosadas y tintas, tanto para vinos de mesa o vinos finos. Entre las variedades cultivadas se encuentran: Criolla grande, Criolla chica, Moscatel de Alejandría, Moscatel Rosado, Pedro Ximenez, Chardonnay, Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon y otras (INV 2016).

Sin embargo, en los últimos 25 años el cultivo ha experimentado un recambio del “porfolio” varietal, lo que se dio a llamar la reconversión vitícola. A partir de ella se

incremento notablemente la superficie cultivada del var. Malbec pasando de unas 20.000 ha a más de 40.000 ha, siendo actualmente la tinta más cultivada. Además este cultivar lidera la escala de exportaciones de vinos finos (INV 2016), lo que ha dado a conocer a la Argentina a través de este varietal por lo que la ha transformado como el emblema nacional. Cabe resaltar que este var. es escasamente cultivado en el resto del mundo.

Por último cabe destacar que la provincia de Mendoza posee una característica particular con respecto a otras vitivinícolas, ya que los oasis productivos se encuentran entre los 600 y 1600 msnm, lo que se ha dado a llamar viticultura de altura. Esta característica ha sido estudiada por la amplitud térmica diaria, especialmente en momento de maduración de los frutos (Deis et al. 2015), y por la acumulación de polifenoles y cambios en tasa de intercambio gases de las hojas debido la radiación ultravioleta a esas altitudes (Berli et al. 2013).

La mayoría de las regiones vitivinícolas del mundo son de escasa continentalidad y/o de alturas cercanas al nivel del mar. En la Figura 1.3 se ejemplifican alguna de las situaciones.

Figura 1.3. El cultivo de la vid en diferentes regiones agroclimáticas del mundo. A) Mendoza, Argentina, zona de viticultura de altura al pie de la Cordillera de los Andes. Zona con 4 estaciones del año bien marcadas con escasa pluviometría en la zona de llanura. Las zonas de producción se encuentran entre los 600 y los 1600 msnm. B) Washington, EEUU, zona con marcado ascenso de la humedad relativa durante el invierno, con lluvias y nevadas constantes. 4 estaciones bien marcadas y una altura en las zonas productivas que rondan los 200 msnm. C) Bento Gonçalves, Brasil. Zona vitivinícola subtropical, con 4 estaciones térmicas menos marcadas, pero con estación seca y otra húmeda. Fotos propias.



1.3. Marco teórico de la resistencia al frío en plantas perennes

1.3.1. Relación de la dormición y la resistencia al frío

Se define como dormición o latencia al estado temporal fisiológico de suspensión del crecimiento visible de cualquier estructura de una planta que contenga un meristema (Lang et al. 1987). Esta etapa en la cual la planta no brota se ha dividido en 3 subetapas. La primera denominada como paradormición, en la cual es inhibida por la acción de otro órgano. Posterior a ello le sigue la etapa de endodormición en la cual la inhibición de la brotación se debe a la acumulación de una hormona (ácido abscísico). Y por último una etapa denominada ecodormición en la cual, no existe una inhibición interna del órgano, sino que este estado se debe a condiciones ambientales como temperaturas o humedad de suelo (Lang et al. 1987). Por otro lado, en las publicaciones relacionados a la temática es común el uso de la denominación estación de dormición (ED) que corresponde al periodo de tiempo entre la caída de hojas y la brotación en coincidencia con la endo y eco dormición descriptas arriba (Jones y Davis 2000; Mills et al. 2006; Ferguson et al. 2011). A la etapa temporal durante la cual se presenta esta dormición se la denomina Estación de Dormición (ED)

Como Resistencia al frío (RF, Cold Hardiness) se define a la capacidad que tienen algunas plantas de soportar temperaturas bajo cero sin sufrir daños significativos

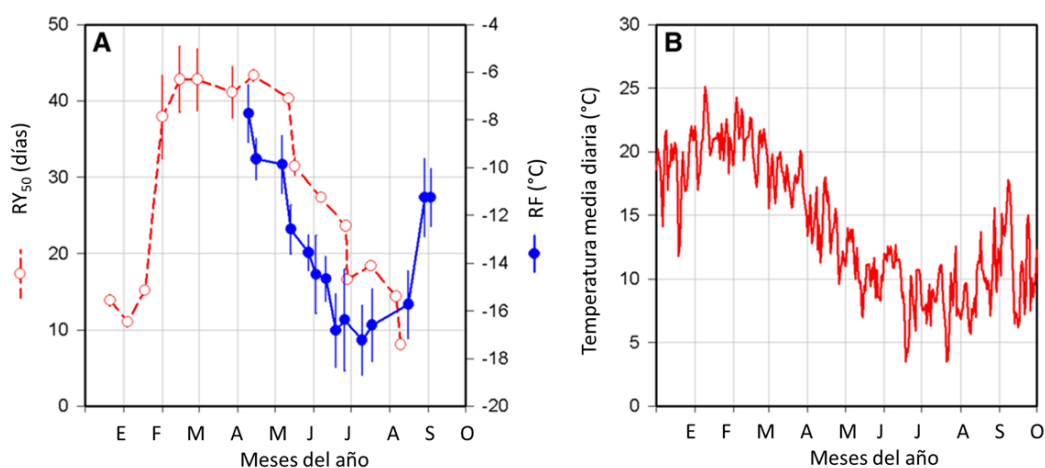
(Linden 2002). De este modo, los procesos de dormición y la RF se interrelacionan y superponen durante parte de la ED (Rubio et al 2016). Es por ello que, una planta en dormición no siempre presenta RF. En vid se ha demostrado que son procesos independientes, y que requieren de diferentes estímulos ambientales para suceder (Salzman et al 1996). Así, mientras la dormición se desencadena solamente cuando el largo del día disminuye, la RF es desencadenada tanto por el acortamiento del día como por la disminución de las temperaturas (Fennell y Hoover 1991).

Se ha demostrado que las yemas de vid están capacitadas para entrar completamente en endodormición sin estar aclimatadas al frío (Fennell y Hoover 1991). Por otro lado, Schnabel (1987) informó que días cortos y disminución de la temperatura, cuando administrados en forma separada, parecen no tener un gran efecto en la RF. De hecho, la vid muestra una pequeña o nula ganancia en su RF en respuesta solo a la disminución del fotoperiodo. Contrariamente, cuando ocurre una disminución del fotoperiodo acompañada de un decrecimiento gradual de las temperaturas, se alcanzan mayores niveles de RF en muchas especies frutales, incluida la vid (Irving y Lanphear 1967, Howell y Weiser 1970, Fuchigami et al. 1982). Así, Keller (2010) estima que son necesarias temperaturas nocturnas de entre 0 °C y 5 °C para que se den inicio a los cambios físicos y bioquímicos necesarios para la RF. Además Salzman et al. (1996) informó que la presencia de los dos estímulos ambientales mencionados desencadenan cambios en el contenido de agua de los tejidos.

Rubio et al (2016) publicó que el desarrollo del estado de dormición sería un prerequisite para la RF, así montando las curvas de estado de dormición de las yemas y RF se puede observar que esta última empieza a desarrollarse a finales del mes de abril

u octubre según hemisferio (Hemisferio sur y Hemisferio norte respectivamente) cuando las mismas yemas ya se encuentran en completa endodormición (Figura 1.4.).

Figura 1.4. Comparación de la temperatura media diaria, endodormición y resistencia al frío (RF) en yemas de vid. a) Desarrollo de la Endodormición y RF en *V. vinifera* var. Thompson seedless. b) Temperatura media diaria en Santiago de Chile (33° 34´S) durante el año 2012. El grado de endodormición se determinó mediante RY_{50} (tiempo requerido para que ocurra la brotación del 50 % de las yemas bajo condiciones ambientales óptimas; $n=50$). La RF se determinó mediante Differential thermal analysis con un $n=16$ (metodología en Capítulo 2). Las barras representan desviación estándar. Tomado y adaptado de Rubio et al. (2016).



1.3.2. Cambios físicos y químicos relacionados a la resistencia al frío

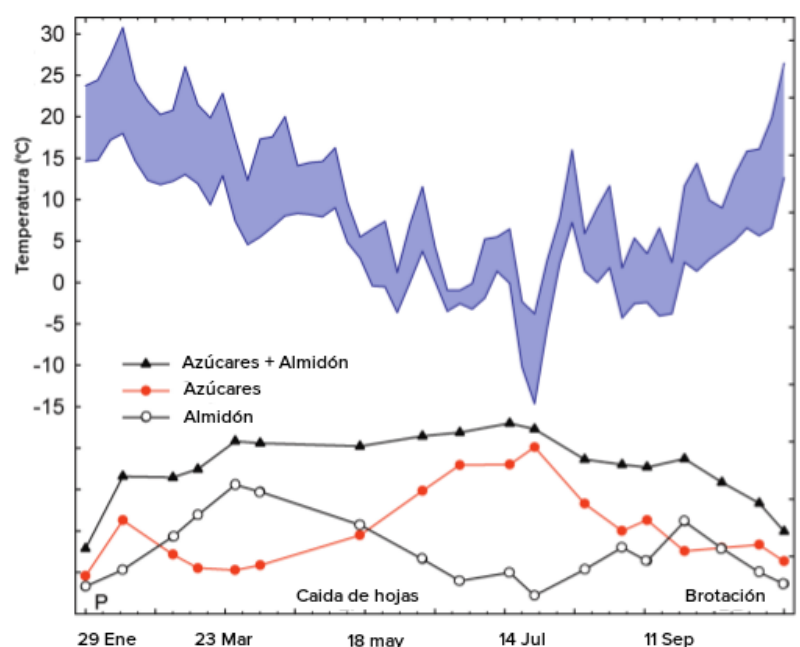
Las plantas poseen diversas estrategias que les permiten sobrevivir a bajas temperaturas. Levitt (1980) sugirió dos estrategias básicas: “tolerancia al congelamiento” (del agua apoplástica) y “escape al congelamiento”. Las estrategias conllevan cambios a nivel morfo-anatómico y físico-químico fueron estudiados por Hamman et al (1996), Candolfi-Vasconcelos et al. (1994), Currle (1983), Fennell (2004) y otros, aunque en forma separada y para distintas especies y variedades.

En el caso de la vid, algunos de los cambios morfo-anatómicos identificados se vinculan a: cambio de consistencia de los brotes por formación de peridermis (de pámpano a sarmiento por un proceso denominado agostamiento en términos vitícolas), formación de pérulas y pelos en yemas, cambio en el contenido hídrico de los tejidos por deshidratación hasta aproximadamente el 50 % (Burke et al. 1976, Kang 1998, Fuller y Telli 1999), traslocación de carbohidratos y minerales a órganos permanentes reservantes como troncos y raíces (Oliveira y Priestley 1988, Wermelinger 1991, Wample y Bary 1992, Jones et al. 1999). Además, Steponkus (1984) informa que también ocurren modificaciones el tamaño de las células, grosor de la pared celular y cambios en los fosfolípidos que componen las membranas plasmáticas.

El agua se congela a 0 °C y forma cristales de hielo. Una de las estrategias para “evitar” la formación de hielo en el interior del citoplasma es un proceso llamado “supercooling” o sobre-enfriamiento debido a la acumulación de solutos compatibles que permiten descender la temperatura de congelamiento varios grados por debajo de 0°C (Keller 2010). La eficiencia del proceso de sobreenfriamiento y los compuestos acumulados dependen de la especie y la variedad (Keller 2010). Los principales solutos compatibles citados en la bibliografía son los azúcares solubles y los aminoácidos libres. En el caso de la vid, se sabe que la planta puede resistir la formación de hielo extracelular, es decir, es tolerante pero a su vez activa este proceso de escape al congelamiento (Hamman et al. 1990, Wolf y Pool 1987, Pierquet et al. 1977, Pierquet y Stushnoff 1980, Quamme et al. 1995). Por otra parte, las reservas energéticas de azúcares se encuentran en forma de almidón, pero aunque este compuesto no es un osmoprotector el mismo se degrada en azúcares simples durante toda la ED por estímulo de la temperatura (Keller 2010, Figura 1.5). Por estímulo del frío aumenta la relación azúcares solubles/almidón. Los

eventos de calor disminuyen esta relación (Currle 1983, Fennell 2004, Guy 1990). Según Keller (2010) los azúcares solubles experimentan un aumento para alcanzar su máximo en pleno invierno (julio) y consecuentemente el almidón disminuye. Sin embargo, para otros autores como Williman y Winkler (1945) la disminución en el contenido de almidón durante el invierno tiene que ver con el consumo por respiración.

Figura 1.5. Dinámica de los cambios de los carbohidratos de las sarmientos en vid durante el invierno. Tomado y adaptado de Keller (2010) para el hemisferio sur.



Por otro lado están involucrados en la RF los aminoácidos libres como arginina, prolina, serina, alanina y asparagina. Estos aminoácidos se acumulan en paralelo a los azúcares hacia finales del verano y comienzo del otoño (Currle 1983). Según Thomashow (1999) la prolina podría ser la responsable de la estabilización de la membrana. Sin embargo entre diferentes autores y especies no hay un consenso con respecto a este aminoácido. En *Lolium* se han registrado incrementos de prolina con la resistencia al frío

(Thomas y James 1993). Duncan y Widholm (1991) han indicado que la concentración endógena de prolina no es el principal factor que determina la resistencia al frío en Maíz.

Los lípidos complejos, como los que se encuentran en las membranas plasmáticas, se caracterizan porque contienen ácidos grasos como constituyentes cuya cadena hidrocarbonada puede estar saturada (ácido palmítico o mirístico) o insaturada (oleico, linolénico). Los ácidos grasos difieren entre sí por la longitud de la cadena hidrocarbonada y la posición y cantidad de sus enlaces dobles. Los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados, especialmente en plantas superiores y en animales que viven en condiciones de bajas temperaturas (Nelson y Cox 2005). Existe evidencia que muestra que el primer sitio de daño por frío en células de plantas es la membrana celular (Heber 1968). Greeham (1966) obtuvo evidencias que demuestran que la integridad de la membrana plasmática puede perderse durante un evento de congelamiento. Druart et al. (2007) informó sobre la síntesis de nuevos lípidos insaturados de membrana como respuesta a bajas temperaturas. Se ha sugerido además que la desaturación de los lípidos existentes en membrana podría estar involucrada en la respuesta de las plantas al congelamiento (Yoshida y Sakai 1974, Yoshida y Uemura 1990). De este modo, los cambios asociados a la resistencia al frío consisten en una disminución de la relación ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos saturados brindan estabilidad en la membrana aportando fluidez y evitando las roturas debido a las tensiones.

1.3.3. Etapas del proceso de resistencia al frío

Los cambios estacionales resultan de una serie de procesos a los que se llamó aclimatación, desaclimatación y re-aclimatación (Levitt 1980). No se tiene un panorama completo de las hormonas involucradas en el proceso de aclimatación pero se cita que el ABA puede reemplazar a estímulo térmico (Keller 2010). Es común que se usen como términos análogos a la aclimatación y ganancia de RF y que en términos numéricos se correspondan con cuantos grados bajo cero (°C) resistan los tejidos antes de morir. Así un tejido estará más aclimatado cuanto más resistencia a las bajas temperaturas presente.

El proceso de aclimatación es dinámico y acumulativo. Mientras se hacen más extremas las condiciones, se alcanza un mayor grado de aclimatación, sin embargo, este puede detenerse, invertirse, volver a empezar, dependiendo de la fluctuación de temperaturas (Howell and Shaulis 1980; Fuchigami et al. 1982; Wisniewski et al. 1996; Keller 2010). Además se podría pensar que en ciertas condiciones ambientales las plantas de vid no alcancen los máximos niveles de aclimatación determinados por el potencial genético (Stushnoff 2010, comunicación personal).

Se ha determinado que las variedades de vides americanas (*V. aestivalis*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*, y *V. vulpina*) tienen una mayor RF que las vides europeas (*V. vinifera*). Así las primeras soportan temperaturas que rondan los - 30 °C, mientras que las segundas alrededor de los - 20 °C. (Londo y Kovaleski 2017)

El proceso de desaclimatación consiste en la reversión del proceso de aclimatación, es decir, provocando la pérdida de RF y dejando a la planta susceptible a las heladas. Los órganos - al desaclimatarse - se hidratan, pierden osmolitos, y ocurren cambios en las membranas plasmáticas. Es un proceso que se da con la elevación de las temperaturas (Andrews et al. 1984, Kaku et al. 1980). Desafortunadamente, la desaclimatación con

temperaturas cálidas parece ser un proceso más rápido que la aclimatación (Keller 2010). Así, la RF puede ser parcialmente disminuida con unos pocos días de temperaturas inusualmente cálidas en pleno invierno (Guy 1990, Mills et al. 2006).

El término reaclimatación hace referencia a una nueva ganancia de RF luego de la pérdida de ella.

1.3.4. Proceso de congelación y medición de muerte en los tejidos

La formación de hielo en el apoplasto comienza entre los -2°C y -5°C ya que tiene baja concentración de osmolitos (Mills et al 2006). Sin embargo se sabe que en vid este hielo no es letal para las células, aunque puede causar deformaciones y tensiones que pueden derivar en rajaduras en los troncos (Ahmedullah 1985). Un tejido aclimatado contiene entre un 10 y 15 % de agua del tejido en el apoplasto. A medida que el agua del apoplasto se va congelando, desciende el potencial agua, por lo que hay una emigración del agua del simplasto y la célula comienza a deshidratarse (Arias et al. 2015).

Heladas prolongadas deshidratan el simplasto hasta el punto de llegar a interferir con el correcto metabolismo celular. La deshidratación del simplasto también trae aparejada una disminución del volumen de la membrana y un estrés físico debido a esta contracción que puede terminar en la ruptura de la misma (Jaglo et al 2001, Zachariassen y Kristiansen 2000). Un ejemplo de especie intolerante a la formación de hielo en el apoplasto es *Olea europea* (Arias et al. 2015).

Por otro lado, la congelación del agua intracelular mata a las células instantáneamente debido al efecto combinado del daño en la membrana, la deshidratación y la

desnaturalización de las proteínas. Al suceder esto se produce la oxidación de los polifenoles, lo cual queda denotado por la aparición de los colores marrones en los tejidos (Goffinet 2004; Mills et al. 2006). Las células del parénquima xilemático de algún modo parecen evitar la deshidratación, presentan un mecanismo más resistente llamado deep supercooling.

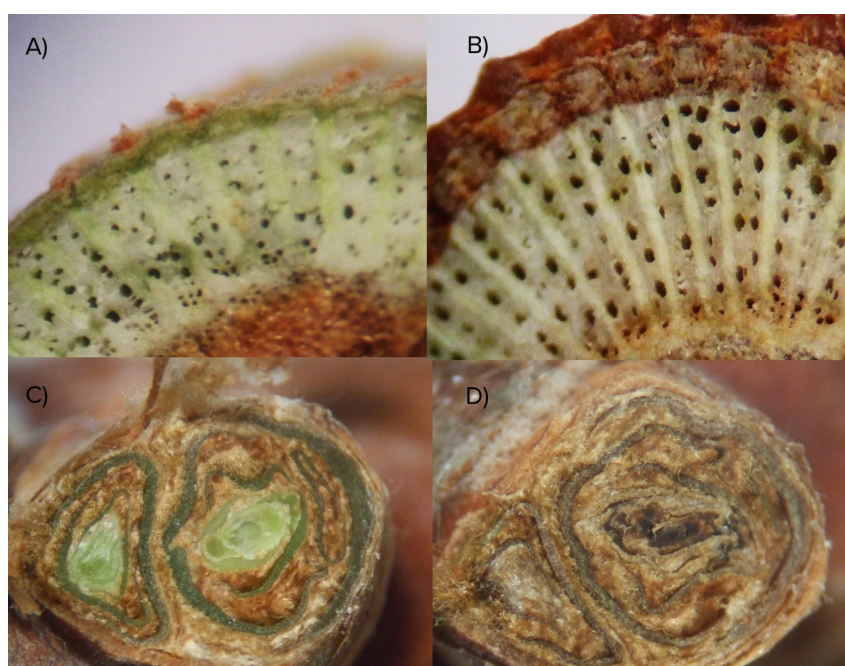
La deshidratación del simplasto por congelamiento extracelular es la causa más común de daño por frío, y la supervivencia del tejido depende de la capacidad de la célula de tolerar la deshidratación (Guy 1990, Thomashow 2000). Es ampliamente aceptado que si sucede la formación de hielo intracelular esto resulta fatal para los tejidos (Glerum 1985).

Con respecto a las técnicas para la evaluación del daño por frío en las células se pueden citar cuatro ampliamente difundidas: observación visual por amarronamiento de los tejidos, DTA (análisis térmico diferencial), fuga electrolítica y tinción con tetrazolio (TTC) (Linden 2002; Fennell 2004). Cualquiera sea el método elegido se realiza luego de una simulación de helada en condiciones controladas, para lo cual se necesita establecer y mantener constante una tasa de descenso de la temperatura. La tasa internacionalmente aceptada para este tipo de estudios es de $-4\text{ }^{\circ}\text{C/h}$. Según Haynes et al. (1992) no se registraron diferencias en los daños de tallos de *Hydrangea* probando tasas de $-2\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ y $-6\text{ }^{\circ}\text{C/h}$.

El método más directo es la observación visual con asistencia de una lupa. Este método requiere mínimo equipamiento de laboratorio, y es considerado confiable a pesar de que es subjetivo y cualitativo (Stergios y Howell 1977, Harrison et al. 1978, Holubowicz 1978). Los tejidos sanos presentan un color verdoso, y se ven hidratados, mientras que cuando se dañan se observan amarronados y deshidratados (Figura 1.6).

Figura 1.6. Tejidos sanos y dañados por frío en sarmientos y yemas de *Vitis vinifera* var. Malbec.

A) fotografía de sarmiento evidenciando floema y xilema de color verde acuoso lo que denota que ambos tejidos están vivos. B) fotografía de sarmiento evidenciando muerte de floema y xilema con una coloración amarillada y una consistencia seca. C) fotografía de yemario de vid (llamada como yema invernante o yema franca en términos vitícolas) en donde se evidencian los tejidos sanos por su coloración verde. D) fotografía de yemario de vid con las dos yemas visiblemente dañadas lo que es denotado por la coloración marrón. Fotografías propias.



A partir de los años 80' se desarrolló el método de DTA que consiste en el registro de salto exotérmicos debido al congelamiento del agua de los tejidos siendo estos captados por un módulo termoeléctrico más bien conocido como placa peltier (Mills et al. 2006). El valor final se registra en milivoltios y puede ser correlacionado a la temperatura de ocurrencia de los picos donde inició el congelamiento del tejido. Si bien el método es indirecto y requiere su calibración con los distintos tejidos y especies,

brinda información objetiva y cuantitativa, por lo que se ha transformado en el método más utilizado para este tipo de análisis en vid.

Algunos autores también han preferido el uso de la fuga electrolítica para determinación del daño celular (Arias et al. 2015). El método se basa en el principio de que el daño de las membranas resulta en la liberación del citosol, incrementando la cantidad de electrolitos (principalmente el K^+) en la suspensión celular. De este modo, se puede estimar el grado de daño a través de la comparación entre los valores de conductividad eléctrica previa y posteriormente a la simulación de heladas. Esta técnica se desarrolló en la década de 1930 y actualmente todavía es ampliamente utilizada y aceptada.

Por último también ha sido utilizado el método asistido por TTC o 2,3,5 trifenil tetrazolio. Este compuesto es incoloro, y al penetrar en los tejidos reacciona, virando hacia la coloración roja por acción enzimática cuando el tejido está vivo, lo que permite develar si las células están vivas o no. La cuantificación puede ser visual o a través de un espectrofotómetro previa calibración de la técnica. Sin embargo este método ha sido cuestionado ya que la coloración roja también puede ser acumulada en tejidos muertos (Palta et al. 1978), por lo que no es común su utilización.

1.3.5. Órganos y tejidos de estudio al evaluar la RF

Se ha informado que los diferentes órganos y tejidos poseen una RF diferencial, y que este depende del momento del ciclo vegetativo en el que se encuentren (Mills et al. 2006). De este modo, los órganos en crecimiento (que tienen un alto contenido de agua) son muy sensibles al congelamiento (Fuller y Telli 1999), ocurriendo daños en hojas, brotes y yemas verdes con temperaturas ambiente de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fennell 2004).

Contrariamente, los órganos en estado de dormancia, al cumplimentar los requerimientos para su aclimatación, son más resistentes al congelamiento. No obstante, los daños por frío en la vid durante la estación de dormición pueden ocurrir en troncos, sarmientos y yemas. Se tiene registro que la yema primaria del yemario de la vid es la más sensible al frío. En cuanto a los tejidos del tronco, el floema es más sensible que el cambium, y a su vez, este es más sensible que el xilema (Pierquet y Stushnoff 1980), debido a que este último se encuentra más deshidratado y hacia el interior del tronco. En este punto es importante aclarar que cuando se trabaja en la temática de RF se considera la parte viva del xilema, es decir, las células parenquimáticas del tejido, excluyendo los vasos funcionales que sufren una muerte celular programada al llegar a la funcionalidad.

1.3.6. Factores intervinientes o modulantes a la RF

Se cita como el máximo determinante de la RF al potencial genético de cada especie, cada cultivar o incluso cada clon. La RF es un proceso activo de adaptación genéticamente regulado y guiado por distintos cambios en el metabolismo y la composición de la célula (Chen 1995). El potencial genético depende de otros factores para expresarse (Wolf y Cooke 1992, Pierquet y Stushnoff 1980). Así algunas especies de coníferas puede resistir hasta - 50 °C, manzanos hasta - 30 °C (Quamme 1991), *Vitis vinífera* entre -15 °C y - 25 °C (Hamman et al. 1996, Davenport 2008, Fennell 2004). Se han encontradas marcadas diferencias en la resistencia de ecotipos y cultivares de una especie (McNamara 1998). Sin embargo eso no siempre se cumple, como se ha demostrado en *Populus*, *Betula* y *Larix* donde no acusan grandes diferencias entre cultivares de una especie (Sakai y Weiser 1973).

La Figura 1.7 refleja la susceptibilidad varietal a los eventos de heladas. Sin embargo como el trabajo se realizó a campo existen algunas interferencias como manejo, sitio, etc.

Figura 1.7. Daños en yemas y sarmientos de diferentes cultivares de vid en Oregon seguidos de fuertes heladas en los años 1972, 1989 y 1990 (Strik 1992)

Least Damage	1)	Foch (1989, 1990) Riesling (1972, 1989, 1990)
	2)	Cabernet franc (1990) Muscat Ottonell (1990) Sauvignon blanc (1990) Auxerrois (1990) Cabernet Sauvignon (1989) Semillon (1990)
	3)	Pinot noir (1972, 1989, 1990) Pinot gris (1990) Chardonnay (1972, 1990) Gamay noir (1990) Fresca (1990) Cabernet Sauvignon (1990)
	4)	Pinot blanc (1990) Cabernet Sauvignon (1972) Limberger (1990) Nebbiolo (1990)
	5)	Chardonnay (1989) Muscat blanc (1989)
	6)	Gewurztraminer (1972, 1989, 1990) Syrah (1990) Muscat blanc (1972)
	7)	Chenin blanc (1989) French Columbard (1972) Merlot (1989, 1990)
	8)	Malbec (1990)
Most Damage		

También está claramente identificado que otro factor dominante de la RF es la temperatura ambiente de los días previos al evento de helada, ya que determina la aclimatación o desaclimatación de los tejidos (Stergios y Howell 1977). En caqui, los árboles pueden sobrevivir hasta -15 o -20 °C si están implantados en zonas frías, pero

en zonas donde los inviernos son más templados los árboles pueden ser dañados con una exposición de 3 horas a -7°C (Sharpe 1966). Sin embargo, las plantas muestran el mismo patrón de evolución de la resistencia durante la estación invernal, y sólo difiere la resistencia (Kang 1998).

Todo factor que tenga relación con el estado vegetativo y la acumulación de reservas influirá en la resistencia al frío. La aclimatación es influenciada por defoliaciones debido a estrés, plagas o enfermedades (Stergios y Howell 1977). Los factores de manejo tienen que potenciar la salud de las plantas y favorecer la acumulación de reservas para lograr una correcta aclimatación. En este sentido influyen la irrigación y el manejo del agua ya que tienen influencia directa con la tasa de fotosíntesis. Además, se sabe que la edad de la planta también está relacionada a la resistencia al frío, siendo las plantas jóvenes menos resistentes que plantas viejas (Brown y Bixby 1976, Strik 1992).

1.4. Principales fundamentos para la realización de esta tesis

- a. Los mecanismos y las resistencias dependen de la especie, e incluso, del cultivar. *Hay escaso trabajos que traten esto para Vitis vinifera var. Malbec*
- b. Se sabe que la RF depende de las temperaturas. *No se ha estudiado la RF a nivel local hasta el momento.*
- c. Según proyecciones de cambio climático, las temperaturas mínimas aumentarán y se presentarán situaciones ambientales más extremas como olas de frío, o calor, vientos Zonda, etc. *Hasta el momento no se ha estudiado el comportamiento de la resistencia al frío de un mismo clon de una determinada variedad de Vitis vinifera ante dos situaciones térmicas contrastantes.*

d. Los eventos de calor extratemperales podrían acelerar la desaclimatación de las plantas de vid y dejarlas más susceptibles a los eventos de heladas.

Mendoza cuenta con una característica climática muy particular ya que el viento denominado Zonda pueden calentar y desecar el ambiente por varios días durante la ED.

e. Mendoza ha enfrentado un proceso de expansión de la frontera vitícola hacia zonas más frías. *No se sabe cómo podría afectar estas nuevas condiciones climáticas en la RF de las vides.*

f. No se han realizado estudios térmicos ni bioclimáticos para la ED de la vid en la provincia de Mendoza. *Los oasis productivos de la provincia podrían tener distinto riesgo en cuanto a las heladas.*

g. Es de común uso las temperaturas obtenidas en casilla meteorológica. *Sin embargo las temperaturas que experimentan las distintas zonas de la planta incluido el interior de la misma podrían estar sometidas a una mayor amplitud térmica diaria.*

h. Según el fisiólogo Markus Keller, experto en la temática de RF, en Mendoza se encuentran los síntomas típicos de daño por frío ocurridos durante la ED (comunicación personal). *No se ha evaluado el alcance de los daños a nivel de planta como de producción.*

i. La información local es escasa con respecto a la temática. *Nuevos aportes podrían ser el inicio de nuevos estudios de índole tecnológica.*

CAPÍTULO 2

Las condiciones macro y microclimáticas pueden alterar la desaclimatación de la vid: variación en la amplitud térmica en dos regiones vitivinícolas contrastantes del Hemisferio Norte y Sur

Este capítulo ha sido publicado en la revista International Journal of Biometeorology

(adjunto como anexo)

2.1. Introducción

El clima afecta la distribución de los viñedos, lo que da lugar a que las principales zonas de vitícolas se encuentre entre los 30-50 ° N y 30-40 ° S. Estas latitudes definen áreas que se corresponden con las isothermas entre 10 ° C y 20 ° C, aproximadamente. La vid al ser una planta perenne de clima templado, cuenta con mecanismos fisiológicos adaptados a la estacionalidad, que a su vez, está modulada por la temperatura. Así, las condiciones cálidas durante la estación de crecimiento (EC, primavera a otoño) son cruciales para el desarrollo de la planta y la producción de fruta, mientras que durante el otoño-invierno el cese del crecimiento conduce a una estación de dormición (ED). Durante esta última estación, la temperatura del aire generalmente cae por debajo del punto de congelación del agua causando daños a los tejidos más vulnerables. Esta situación es una de las principales causas de pérdidas de rendimiento y / o muerte de la planta en vid (Fennell 2004).

Dos factores, la resistencia al frío de la planta (RF) y la temperatura, interactúan para determinar el daño tisular por congelación. La mayor parte de las investigaciones se han centrado en la RF, ya que este fenómeno constituye un rasgo dinámico y complejo adquirido en respuesta a un acortamiento del foto-periodo y la disminución de la temperatura en otoño (Howell y Shaulis 1982; Wisniewski et al. 1996). Se identifican tres etapas diferentes para RF: i) aclimatación, cuando las plantas ganan RF; ii) la desaclimatación, cuando las plantas pierden RF; y iii) reaclimatación, cuando las plantas recuperan RF después de la desaclimatación temporal (Levitt 1980). Las tasas de aclimatación y desaclimatación varían dinámicamente durante el ED y son reversibles (Damborska 1978, Wolf y Cook 1992, Gu et al. 2002). De este modo, la RF es un proceso

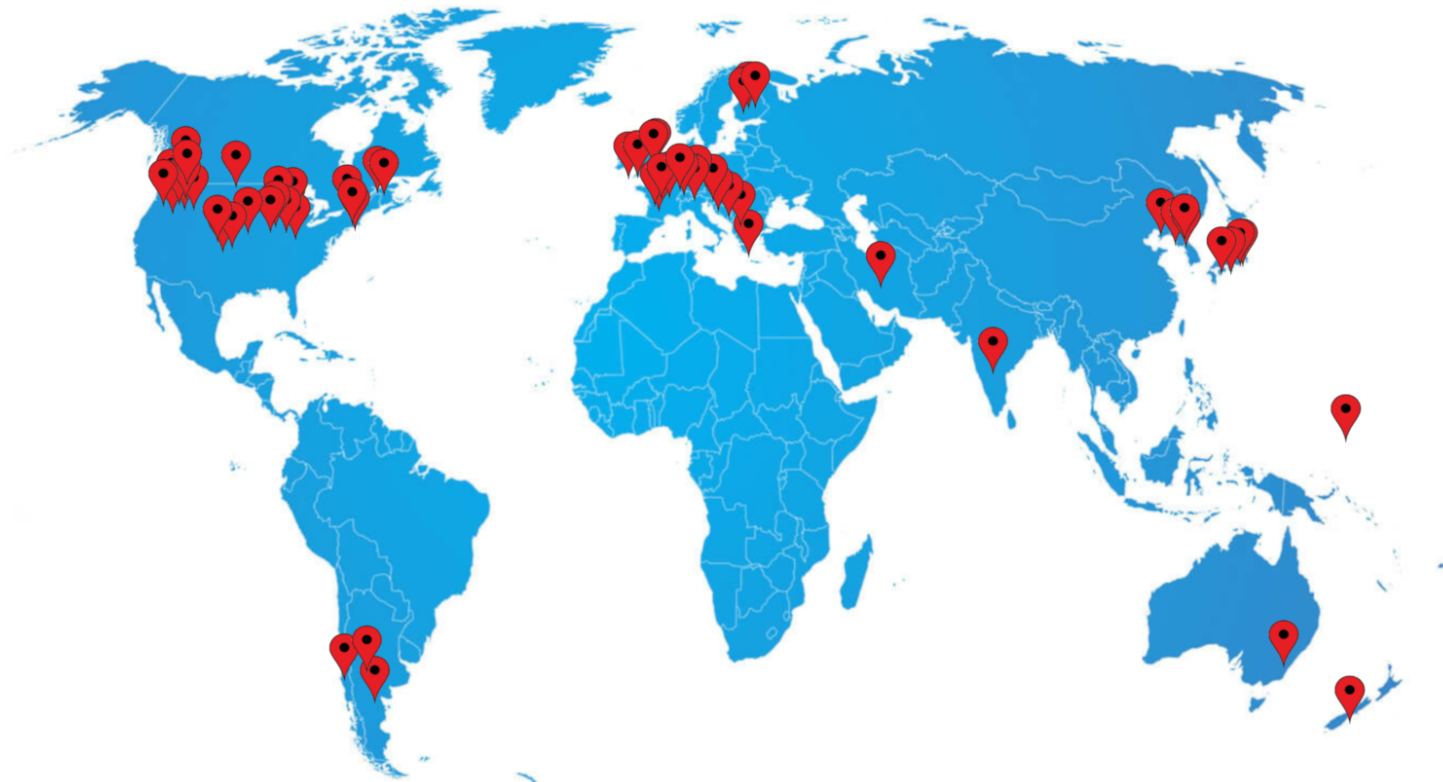
reversible, por lo tanto una planta resistente al frío puede desaclimatarse y luego volver a aclimatarse dependiendo de las temperaturas del invierno. Este proceso difiere con las especies, el cultivar, la fenología, el órgano, el clima y el manejo de los cultivos (Wample y Wolf 1996). La temperatura, el segundo factor, es un parámetro complejo y es altamente variable en el tiempo y el espacio, afectando directamente a los sistemas biológicos (Eagles 1989; Sage y Kubien 2007). Las temperaturas se pueden considerar a diferentes escalas espaciales: macroclima (una escala regional de decenas a cientos de kilómetros), mesoclima (una escala de diez a cientos de metros) y microclima (entorno específico de cualquier planta) según Robinson (2006). Tradicionalmente, se ha medido un número limitado de parámetros para estimar la condición térmica en las tres escalas mencionadas: i) temperatura máxima (T_{\max}); ii) temperatura mínima (T_{\min}); iii) temperatura media diaria (T_{media}); iv) amplitud térmica diaria (AT), y v) humedad relativa (HR). Estos parámetros se obtienen tradicionalmente de las estaciones meteorológicas convencionales (EMC) que, de acuerdo con las normas internacionales, consisten en un refugio de madera blanca situado a 1,4 m sobre el suelo y con sensores protegidos de la influencia de la precipitación y la radiación directa. Por otra parte, estas estaciones se encuentran a menudo a una distancia considerable de los viñedos. Esta combinación de elementos a suele conducir a una estimación inferior o superior a la del ambiente térmico real a la cual está sometida una planta, lo que puede dar lugar a una mala interpretación y / o minimización de la influencia de la temperatura sobre el daño a las plantas.

En el hemisferio norte la mayoría de los viñedos se encuentran más allá de 40 ° N y se ven afectados por contingencias climáticas recurrentes debido a daños por congelación. Esto implica un impacto directo en la producción de los viñedos (Mills et al.

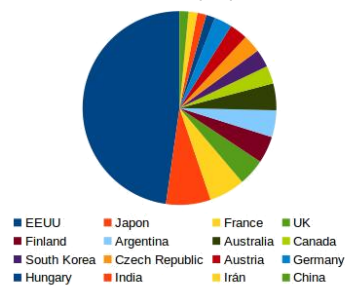
2006, Cragin et al 2017, Hamman et al. 1996, Fenel 2004, Keller y Mills 2007) y ha determinado que realicen un monitoreo y medición permanente y en tiempo real de la RF (www.wine.wsu.edu/research-extension/weather/cold-hardiness). Por otra parte, en el Hemisferio Sur la mayoría de los viñedos están ubicados en regiones marítimas (por ejemplo, Nueva Zelanda, Chile, Australia y Sudáfrica) con baja incidencia de daño por congelación (Mullins et al. 1992). Sumado a esto, existen escasos datos regionales sobre RF en este Hemisferio Sur tanto para viñedos como otros frutales de climas templados (Figura 2.1). La provincia de Mendoza (MZA), la principal región productora de uva de Argentina, es una excepción a esta condición ambiental del Hemisferio Sur, como lo demuestra un alto nivel de continentalidad y altitud (Tabla 2.1).

Los síntomas típicos de lesión por frío incluyen la falta de y / o la brotación irregular de las yemas, la muerte de la parte aérea, el rebrote de la planta desde el suelo y el agrietamiento del tronco (Brusky Odneal 1983). En MZA estos síntomas también se han observado, pero se han atribuido a la sequía y el ataque de patógenos porque el daño por congelamiento no se considera un factor crítico en los viñedos (Kaiser et al. 2003). Esto ocurre en primer lugar, ya que hay poca información disponible sobre el rango de RF en los cultivares de vid de los viñedos locales, por lo que generalmente estos datos se extrapolan de los estudios realizados en el hemisferio norte. En segundo lugar, la mayoría de las condiciones microclimáticas de campo se calculan por extrapolación a partir de datos generados en EMC y no de sensores de temperatura instalados a nivel de planta. Por último, la variabilidad entre los años en la temperatura invernal, hace que sea difícil asociar a los síntomas del daño con el frío tanto por productores como agrónomos.

Figura 2.1 Meta análisis de 100 publicaciones sobre resistencia al frío en plantas frutales de todo el mundo según países y décadas. Marcas rojas sobre el mapa indican origen de las publicaciones.



Publicaciones por países



Publicaciones según década

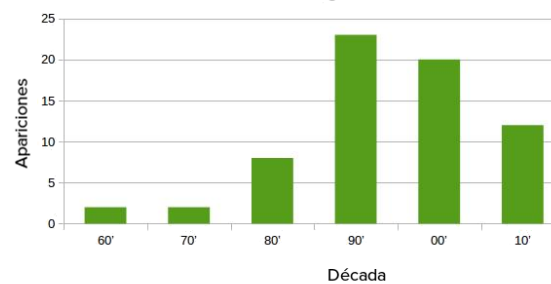


Tabla 2.1 Comparación de las condiciones climáticas y geográficas entre MZA y WA.

(Fuentes: Climatic-data.org, 2017, Google earth, 2017)

Atributo	MZA	WA
Latitud (°)	32-35 ° S	46-49 ° N
ASNM (m)	766	117
Koppen-Gieger clasificación	BW.k – árido desértico y frío	BS.k – árido, estepa y frío
Precipitación anual (mm)	213	204
Régimen pluvial	Verano	Invierno
Temperatura promedio anual (°C)	16.4	12
Océano de influencia	Pacífico	Pacífico
Cordillera de influencia	Los Andes	Las Cascadas
Condición frente a los vientos	Sotavento	Sotavento
Altitud media de la cordillera (m) *	4000	1300
Ancho de la cordillera (km) *	150	70
Distancia de cordillera a viñedos (km)	20	130
Continuidad	Continua	Discontinua
Índice de continentalidad (Ivanov)	Clima continental (165.3)	Levemente continental (122.7)
Índice de continentalidad (Conrad; %)	26.9	10.6

MZA está situada en el centro-oeste del país, a los pies de la cordillera de los Andes, mientras que la región vitivinícola del este de Washington (WA), EE.UU., es un área situada entre las cordilleras de Las Cascadas al oeste y la Cordillera de las Montañas Rocosas al este (Tabla 2.1). Ambas regiones muestran similitudes orográficas y están sujetas a vientos cálidos periódicos del Océano Pacífico denominados localmente *Zonda* en Argentina y *Chinook* en Estados Unidos. Estos vientos son fuertes y cálidos y se asocian con la compresión adiabática al descender por laderas orientales de las cordilleras (Norte y Simonelli 2015). Ambos, *Zonda* y *Chinook*, ocurren principalmente durante el ED, lo que provoca períodos de calentamiento extra-temporales. Por otra parte, luego de los días ventosos a menudo son seguidos de fuertes eventos de

heladas. Sin embargo, no está claro cómo estos eventos de calentamiento extra-temporal influyen en el estado de RF.

Este capítulo tuvo como objetivo comparar las condiciones climáticas entre MZA y WA durante el ED para entender las diferencias y similitudes y develar por qué hay daño de congelación en ambas regiones a pesar de sus diferencias. Esta comparación se realizó en tres escalas: i) macroclima, utilizando 10 años de datos climáticos registrados de EMC (T_{\max} , T_{\min} , HR y AT); ii) mesoclima, comparando las mediciones diarias de temperatura de campo con los datos registrados por EMC para evaluar su fiabilidad y exactitud para predecir las condiciones de campo reales; y iii) microclima, evaluado a nivel de planta, para determinar cuáles son las partes más vulnerables de la planta. Un segundo objetivo fue evaluar cómo AT durante el ED puede determinar la pérdida de RF en plantas aclimatadas. Para este propósito, se realizaron experimentos de corto término con plantas aclimatadas expuestas a diferentes tratamientos de AT durante 24 horas para medir la tasa de desaclimatación después de esta exposición.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Condiciones de macroclima en MZA y WA.

Las condiciones meteorológicas durante la ED del viñedo (período otoño-invierno) fueron evaluadas durante 10 años (2002-2012) en las regiones de MZA y WA utilizando datos recogidos en dos estaciones meteorológicas oficiales: una estación de la DACC (Dirección de contingencias climáticas de la provincia de Mendoza) INTA La Consulta, San Carlos, Provincia de Mendoza, Argentina (33 ° 43 '10' 'S lat, 69 69 ° 0,6' 16 " W de largo) y otra de la Universidad Estatal de Washington, AgWeatherNet (<http://weather.wsu.edu>), estación ubicada en la sede de IAREC, Washington, EE.UU. (46 ° 15 '25' 'N, lat, 119 44' 25 " W long). Para estandarizar los datos de los hemisferios Norte (HN) y Sur (HS), al comienzo del otoño en cada hemisferio se lo consideró como el día 1 de la ED. Los parámetros diarios evaluados en este estudio fueron T_{\max} , T_{\min} , AT, HR. La ED se dividió en tres etapas diferentes: ED temprana correspondiente a abril-mayo en HS y octubre-noviembre en HN, ED intermedia que correspondió a junio-julio en HS y diciembre-enero en HN (alrededor del solsticio de invierno) y la ED tardía que correspondió a agosto-septiembre en HS y febrero-marzo en HN.

2.2.2. Comparación entre las mediciones de temperatura en campo y EMC.

La caracterización de condiciones microclimáticas de campo se realizó en viñedos pertenecientes al Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (UNCuyo) en Luján de Cuyo, MZA (33° 00' 60" S latitud; 68° 52' 21" W longitud)

y al Centro de Investigación y Extensión Agrícola bajo riego (IAREC) en Prosser, WA (46.2° 15' 25" N latitud, 119° 44' 25" W longitud) durante el ED del 2013 y 2012.

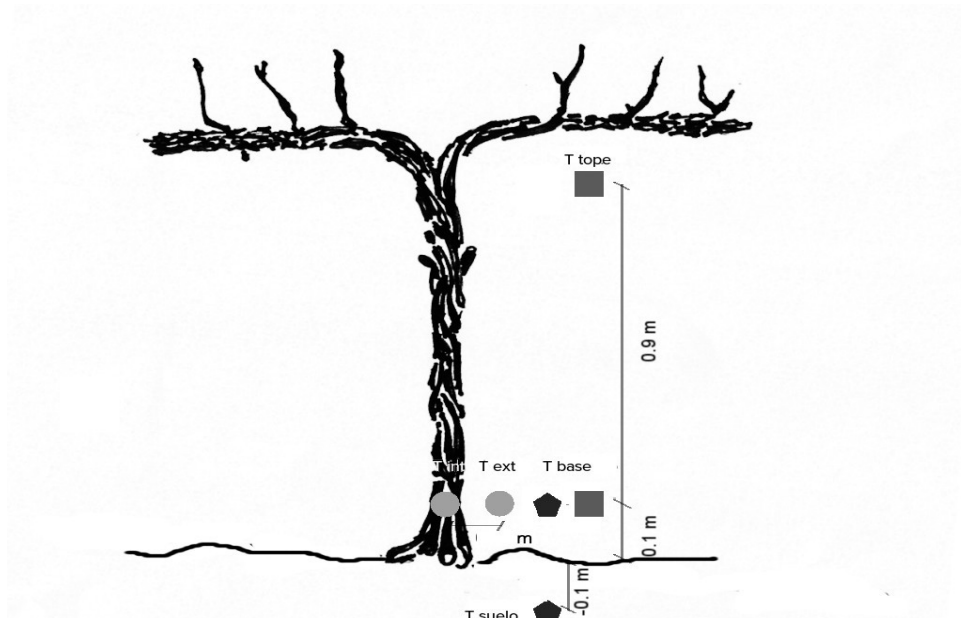
Para determinar las diferencias de temperatura entre el campo y el EMC de ambos lugares, se utilizó el mismo equipo para registrar datos de campo (registradores de temperatura Thermochron DS1922L-F5 iButton, Maxim Integrated, San José, CA con un rango de medición de -40 a +125 °C y precisión $\pm 0,5$ °C). En cada sitio del viñedo, se instalaron tres sensores adyacentes a troncos de vid a unos 40 cm sobre el suelo y protegidos de la radiación solar por paneles reflectores. Las temperaturas se registraron cada hora durante febrero-marzo de 2012 en WA y durante julio-agosto de 2013 en MZA y se utilizaron para calcular T_{\min} y T_{\max} diarios. Los datos se registraron durante al menos 15 días en la ED intermedia, y se repitieron tres veces en cada lugar. Para comparar las temperaturas en condiciones de campo con las registradas de EMC situadas cerca de los viñedos (500 m aproximadamente), también se obtuvieron temperaturas máximas y mínimas diarias para el mismo período de tiempo. En el caso de los viñedos del MZA, los datos se obtuvieron de la Estación Meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias (33° 00' 18" S de latitud, 68° 52' 13" W longitud), mientras que para los de WA, la Estación Meteorológica fue la sede de IAREC descrita anteriormente.

2.2.3. Condiciones microclimáticas de la planta

Con el fin de caracterizar las condiciones microclimáticas cercanas a las vides durante el ED, se realizaron tres ensayos independientes, como se indica en la Figura 2.2: A) diferencias térmicas del aire entre la parte superior (T_{tope}) y la base (T_{base}) de la planta se midieron con sensores situados a 1 m y 0,1 m sobre el suelo, respectivamente. B)

Comparación sobre suelo y bajo suelo con sensores instalados cerca de la planta a 0,1 m sobre el suelo (T_{base}) y a 0,1 m por debajo del suelo (T_{suelo}). C) Temperatura interna del tronco (T_{int}) frente a la temperatura del aire cerca de la planta (T_{ext}), con sensores instalados a 0,1 m sobre el suelo, uno dentro del tronco y el otro colocado a la misma altura pero separado 0,1 m de la planta.

Figura 2.2. Caracterización del microclima de vid durante la estación de dormición en Mendoza, Argentina (MZA) y Washington, USA (WA). Se realizaron tres ensayos independientes. A) Diferencias térmicas del aire entre la parte superior (T_{tope}) y la base (T_{base}) de la planta, con sensores (■) situados a 1 m y 0,1 m, respectivamente; B) Diferencias térmicas suelo / aire con sensores (◆) instalados cerca de la planta a 0,1 m sobre el suelo (T_{base}) y -0,1 m por debajo del suelo (T_{suelo}); C) Temperatura interna del tronco (T_{int}) frente a la temperatura del aire cerca de la planta (T_{ext}) con sensores (●) instalados a 0,1 m sobre el suelo, uno dentro del tronco y el otro a una distancia de 0,1 m de la planta.



Debido a que los iButtons no podían colocarse en el tronco, se instalaron termocuplas en la parte interna del tronco perforando un orificio de 1 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. A continuación, se insertó una termocupla de tipo T (cobre-constantano,

rango de medición -40 a +125 ° C, precisión $\pm 0,1$ ° C) a nivel del floema del tronco (5 mm de profundidad) y luego se tapó con cinta adhesiva. Los datos de la termocupla fueron recolectados por dataloggers de diferentes marcas pero con las mismas funciones: Cava Devices, 4 canales en Argentina y Campbell Scientific CR10 en USA. Todas las mediciones de temperatura se realizaron en 3 plantas adyacentes de *Vitis vinifera* var. Malbec en MZA y *Vitis labrusca* var. Concord en WA. Las plantas de cada cultivar tenían troncos de diámetro similar (entre 4 y 5 cm) y tenían una edad similar (de 8 a 10 años). Las mediciones se recolectaron por hora por los datos se dividieron en dos partes, día y noche. Se consideró como mediciones diurnas a las que se tomaron de 8:30 am a 7 pm en MZA y de 7:30 am a 5 pm en WA.

2.2.4. Efecto de la alta AT en la desaclimatización de los brotes y diferente tejidos de las sarmientos

Para este experimento a campo se utilizaron vides de 12 años de edad var. Chardonnay y var. Merlot que fueron muestreadas en viñedos de IAREC (WA). Se seleccionaron veinte plantas por cultivar y se cortó una sarmiento completa de cada una por encima del 4º nudo para conservar los nudos más basales para la próxima poda. Sólo se utilizaron de los brotes, los nudos del 4 al 8 y se dividieron en secciones diferentes de yemas y entrenudos, se mezclaron y se asignaron al azar para los distintos tratamientos de congelación (n = 20 yemas y m = 8 para los entrenudos). Cada sarmiento se dividió en dos partes: la yema y las secciones internodales. La sección de la yema consistió en la propia yema y cerca de 2 mm de tejido de sarmiento por encima y por debajo de la misma (Andrews 1984; Wolf y Pool 1987). La sección internodal de la sarmiento consistió

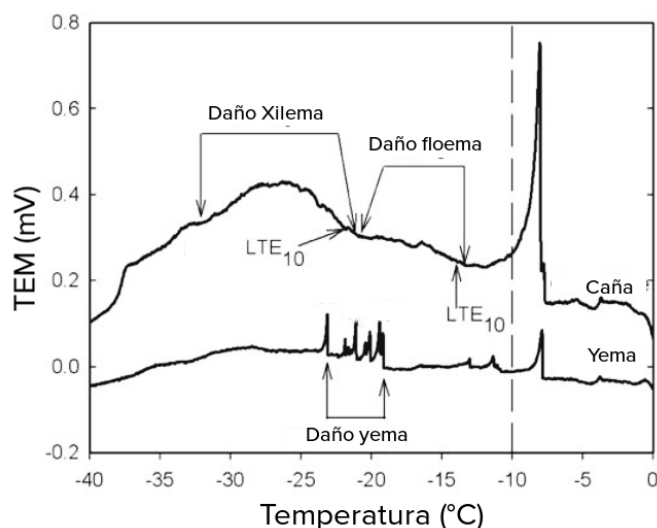
en un tejido de sarmiento de 2-3 cm de largo sin la sección de la yema. El material vegetal se obtuvo después del amanecer (9:00 AM). Las sarmientos muestreadas se colocaron en bolsas de plástico con un papel húmedo en el interior para evitar la deshidratación. Además, durante el transporte y preparación de las muestras en el laboratorio se colocaron en una caja de telgopor. Se cosechó a esa hora ya que las temperaturas ambientales se mantuvieron ligeramente por encima de 0 ° C y con ello se evitó una posible desaclimatación.

Se aplicaron tres tratamientos simulando diferentes cambios de temperatura antes de las condiciones de congelación para determinar la temperatura de desaclimación de las yemas y las secciones internodales. Los tratamientos fueron A) Control: secciones sin tratamiento térmico y evaluadas después de la recolección; B) AT baja: secciones mantenidas a 7 ° C en un frigorífico durante 24 h; C) Alta AT, mantenida a 30 ° C en un gabinete de calentamiento durante 24 h.

Tras este tratamiento térmico, se estimó la RF de las yemas de vid y los tejidos de sarmiento de cada tratamiento mediante el método de análisis térmico diferencial (DTA), que indican la temperatura de congelación intracelular letal, basado en las exotermas a baja temperatura (LTE). Este método fue demostrado por Mills y colaboradores (2006) y se correlacionó muy estrechamente con el daño visual del floema de sarmiento y el xilema, basado en el amarronado de los tejidos. El DTA consiste en una cámara de módulos termoeléctricos (TEM) integrada con un congelador programable disponible comercialmente y un sistema de adquisición de datos (DAS). El módulo TEM consiste en 40 canales de placas Peltier modelo CP1.4-127-045L (Melcor Corporation, Trenton, NJ) que detectan exotermas producidos cuando el agua o los tejidos se congelan en cada canal y convierten estas señales térmicas a una tensión de salida (mV). El modelo de

congelador programable T2C (Thermal Product Solutions, Williamsport, PA) estaba equipado con un controlador de temperatura modelo 44212; (YSI, Dayton, OH) que detecta las temperatura del congelamiento. Todas las mediciones de los canales TEM individuales y la temperatura fueron adquiridas y registradas a intervalos de 15 segundos en DAS, que consisten en un datalogger de parámetros múltiples Keithley modelo 2700-DAQ-440 (Keithley Instrument, Cleveland, OH). Las exotermas a baja temperatura (LTE) que corresponden a 10% de lesión de floema y 10% de lesión de xilema, respectivamente, se determinaron como se muestra en la figura 2.3

Figura 2.3. Perfiles típicos de DTA de exotermas de baja temperatura (LTE), indicando congelación intracelular letal. De dos líneas observadas (TEMs) una corresponde a yemas y muestra cinco picos correspondiendo 1 pico por cada yema (línea inferior) o la otra corresponde a sarmientos (línea superior) donde se observan 2 picos, un primero correspondiendo al daño en floema y un segundo a más bajas temperaturas correspondiendo a xilema. Las exotermas de alta temperatura (HTE), que indican la congelación extracelular no letal, se muestran a la derecha de la línea discontinua de -10°C . © Sociedad Americana de Enología y Viticultura. AJEV 57: 194-200



Las muestras se colocaron directamente el módulo TEM. De cada tratamiento, se colocaron veinte yemas con la superficie cortada hacia arriba y ocho secciones de sarmiento directamente sobre cada módulo TEM. La tasa de descenso para la simulación de congelación fue el estándar para el método DTA de 4 ° C/h (Mills et al. 2006). Se demostró que esta tasa de descenso es estadísticamente similar sobre las lesiones por frío si se compara con las tasas reales observadas en el campo (Haynes et al. 1992).

Las temperaturas letales para brotes se informaron como Yema TL10, (es decir, temperaturas letales a las que se mueren el 10% de los brotes, Andrews et al. 1984). Para las secciones de entrenudos, las temperaturas letales se informaron como floema TL10 y xilema TL10.

2.2.5. Análisis estadístico

Para el análisis de las condiciones macroclimáticas de los dos lugares contrastantes (MZA y WA), se utilizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM), el modelo final incluyó el día del año estandarizado y la ubicación como efecto fijo y el año como un efecto aleatorio. Los datos se dividieron según el subperíodo de la ED (temprana, intermedia y tardía). Entre diferencias entre los valores medios de Tmax, Tmin, AT y HR se determinaron mediante el ensayo DGC con $\alpha < 0,05$ (Di Rienzo et al. 2002).

Para comparar los datos obtenidos de los sensores de campo con los datos de EMC se utilizó una prueba t pareada con $\alpha < 0,05$. Se estimaron las diferencias diarias entre la

estación meteorológica y los sensores de campo de T_{\max} ($T_{\max \text{ diff}} = T_{\max \text{ Estación}} - T_{\max \text{ Campo}}$) y T_{\min} ($T_{\min \text{ diff}} = T_{\min \text{ Estación}} - T_{\min \text{ Campo}}$). El mismo análisis se aplicó para AT.

El T_{\max} , T_{\min} y AT diarios medidos en el análisis microclimático se analizaron con la misma metodología empleada para las condiciones macroclimáticas. El tiempo (en minutos) se consideró como un efecto fijo, mientras que la temperatura medida por los sensores se consideró como un efecto aleatorio y los datos se dividieron en valores de día-noche. Además, en el análisis del gradiente de T_{int} versus T_{ext} se estimó el día promedio utilizando un modelo lineal generalizado (GLM).

Para el análisis de las diferencias en RF entre tejidos, tratamientos y cultivares, se utilizó ANOVA-de una vía. Cuando los efectos fueron significativos, se realizaron comparaciones múltiples utilizando la prueba post-hoc de DGC.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Infostat v. 2017.

2.3. Resultados

2.3.1. Comparación de las condiciones macroclimáticas entre MZA y WA

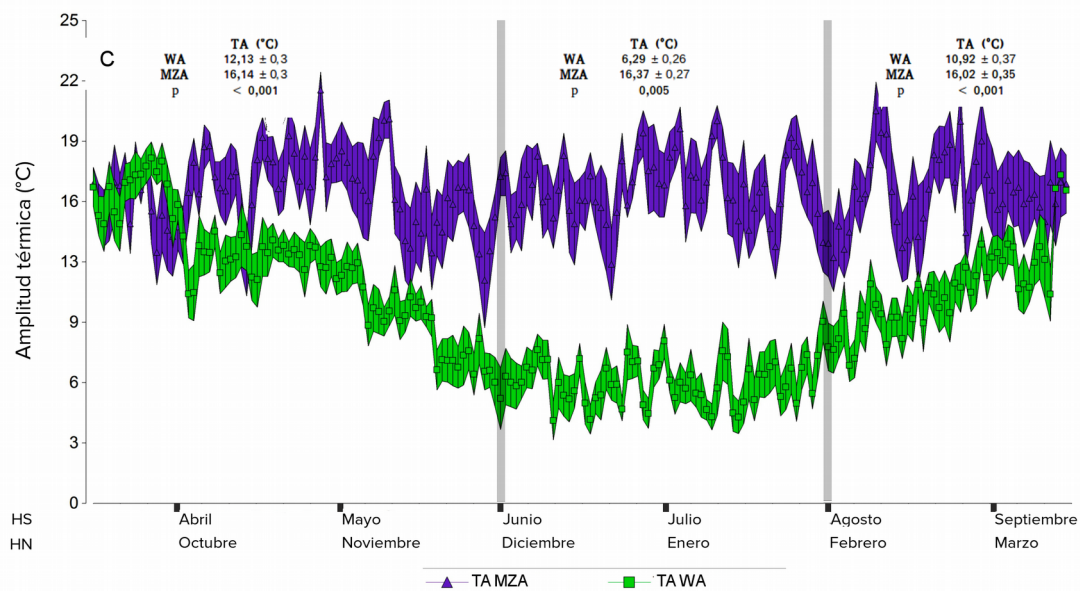
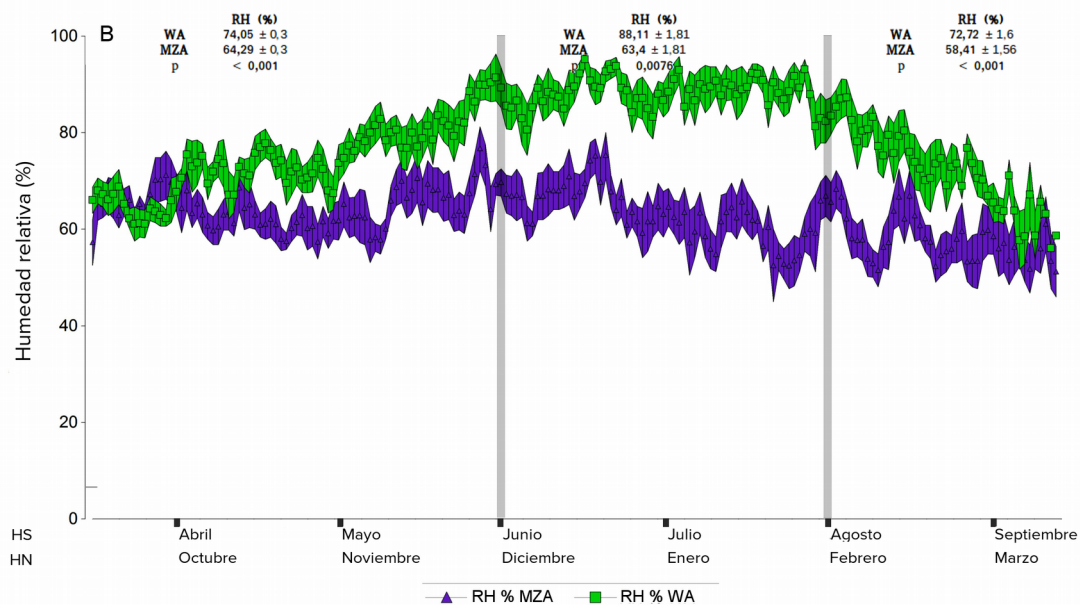
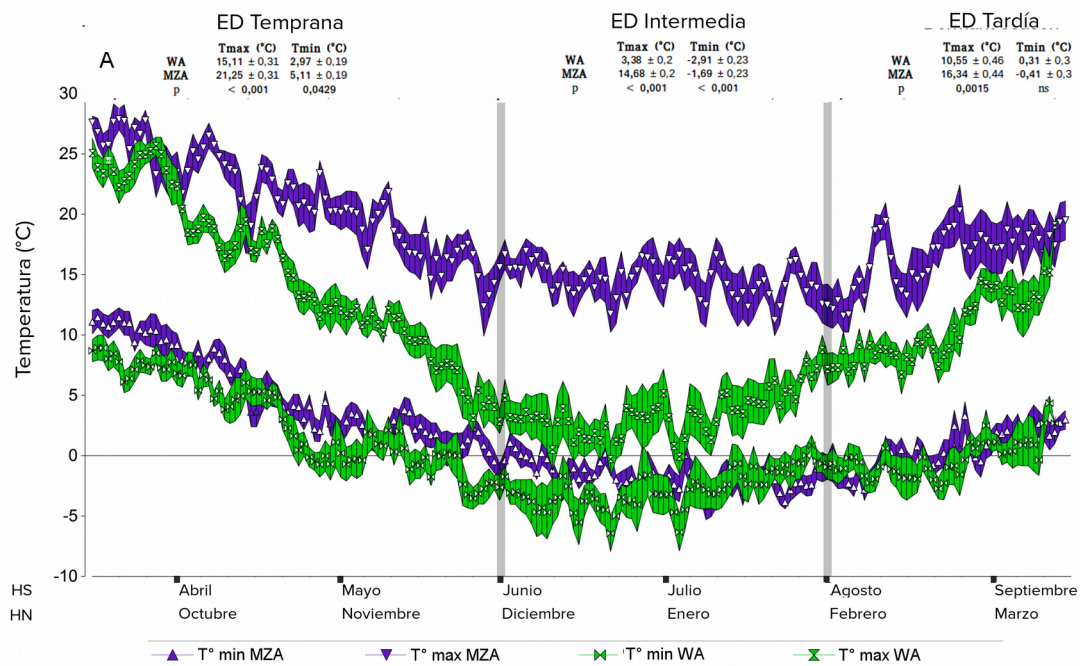
El promedio diario de temperatura durante la ED en el período de 10 años analizado fue mayor en MZA (9,8 ° C) que en WA (5,2 ° C). Por otra parte, T_{\max} promedio fue siempre mayor MZA que en WA ($T_{\max \text{ MZA}} - T_{\max \text{ WA}}$ fue de 6.2, 11.3 y 5.8 ° C durante la ED temprana, intermedia y tardía, respectivamente). Por el contrario, T_{\min} fue relativamente similar en los dos lugares y sólo mostraron diferencias significativas durante la ED intermedia

($T_{\min MZA} - T_{\min WA}$ fue de -2,1, -1,2 y -0,1 ° C durante la ED temprana, intermedia y tardía, respectivamente). Se observaron diferencias significativas importantes durante la ED intermedia (Figura 2.4A).

El MZA, la HR se mantuvo relativamente constante a lo largo de toda la ED, oscilando alrededor del 60% (caracterizada por una estación de invierno seca). Por otra parte, la HR en WA comenzó a aumentar durante el ED temprana y alcanzó un pico de casi 90% en la ED intermedia (caracterizada por la alta frecuencia de lluvias y nevadas) para disminuir gradualmente durante la ED tardía hasta alcanzar valores similares a los registrados en MZA (Figura 2.4B).

La progresión estacional de AT muestra un patrón opuesto al de la HR (Figura 2.4C). Por consiguiente, en el MZA la AT fue relativamente constante en toda la ED (alrededor de 16 °C) pero con una variación interanual significativamente mayor ($MZAvar_{(n-1)} = 27.6$ °C y $WAvar_{(n-1)} = 11.3$ °C; $p < 0,0001$). A diferencia de MZA, la AT en WA mostró una disminución gradual durante la ED temprana, alcanzando valores mínimos de cerca de 6 °C durante la ED intermedia, para continuar con un aumento gradual durante la ED tardía.

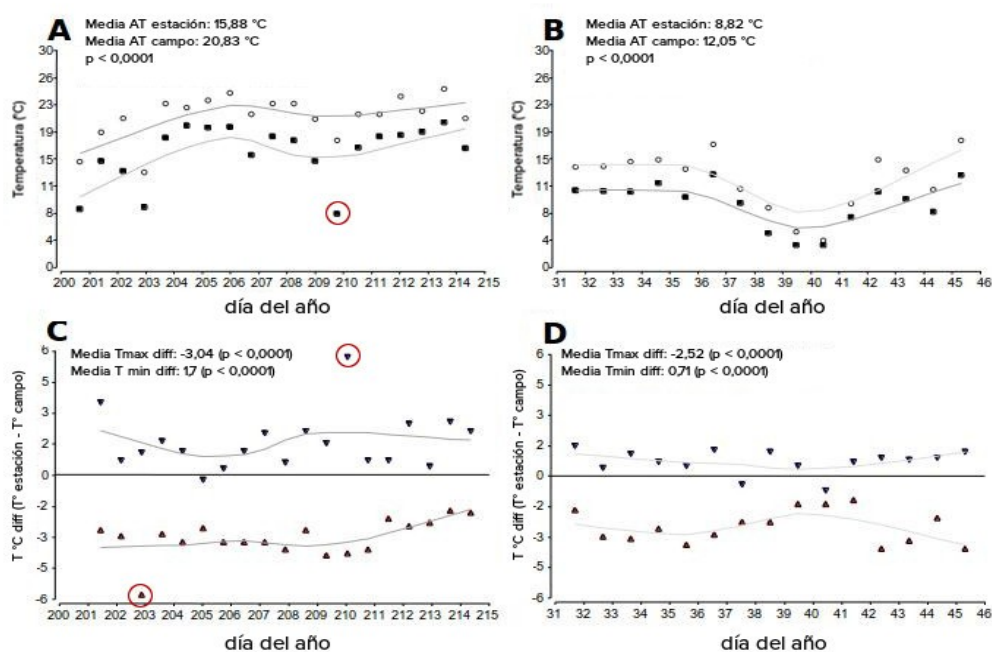
Figura 2.4. Diez años de registros macroclimáticos (2002-2012). Mendoza, Argentina (MZA, 33° 43' 10" S de latitud, 69° 0,6' 16 " de longitud W) y Washington, USA (WA, 46° 15' 25"N latitud, 119 44" Longitud W). A) Comparación de las temperaturas máximas diarias (T_{\max}) y mínimas (T_{\min}); B) Humedad relativa (HR) y C) amplitud térmica (AT) Durante la estación de dormición temprana, intermedia y tardía de la vid (octubre-marzo en EEUU y abril-septiembre en Argentina). Las diferencias significativas entre los valores medios se determinaron mediante la prueba DGC con $\alpha < 0,05$ ($n = 10$ años)



2.3.2. Comparación entre las mediciones de temperatura a Campo y las EMC

Se encontró una estrecha correlación entre los datos obtenidos de los sensores de campo y EMC en MZA y WA (MZA: T_{maxcampo} vs $T_{\text{maxestación}}$ $r^2 = 0,91$ y T_{mincampo} vs $T_{\text{minestación}}$ $r^2 = 0,92$; WA: T_{maxcampo} vs $T_{\text{maxestación}}$ $r^2 = 0,90$ y T_{mixcampo} vs $T_{\text{mixestación}}$ $r^2 = 0,92$). Sin embargo, en ambos sitios (MZA y WA), la AT registrada cerca de las plantas (condiciones de campo) fue significativamente mayor que la registrada por el EMC (Figura 2.5). En WA la AT tanto en campo como en EMC fueron más bajas que en MZA.

Figura 2.5. Comparación de la variación mesoclimática entre las condiciones de campo y la estación meteorológica convencional en Mendoza, Argentina (MZA, izquierda) y Washington, Estados Unidos (WA, derecha). A y B muestran la variación de amplitud térmica diaria medida en el campo (○) y por las estaciones meteorológicas (■). C y D muestran diferencias en T_{max} (▲) y T_{min} (▼) entre la estación meteorológica y el campo ($T_{\text{diff}} = T_{\text{estación}} - T_{\text{campo}}$). También se muestran los valores medios de amplitud térmica, T_{maxdiff} y T_{mindiff} . Los símbolos circulares indican valores extremos. Las líneas representan la tendencia. Las mediciones se realizaron durante la estación de dormición de 2013 y 2012 en MZA y WA, respectivamente.



Las diferencias de T_{\max} y T_{\min} registradas entre el campo y el EMC revelaron que en ninguno de los casos la diferencia AT era igual a cero. Sin embargo, la EMC tendió a subestimar T_{\max} y sobreestimar T_{\min} (Figura 2.5). Las plantas de campo fueron expuestas a mayores valores de T_{\max} que los registrados por la EMC: T_{\max} promedio fueron 3,04 °C y 2,52 °C más alto en el campo que en las EMC para MZA y WA, respectivamente. Además, los valores medios de T_{\min} fueron 1,70 °C y 0,71 °C más bajos en el campo que los valores de EMC para MZA y WA, respectivamente. Es importante observar que a veces se encontraron diferencias bastante grandes (por ejemplo, 10 °C) entre las temperaturas registradas en campo y EMC (símbolos en círculo en la Figura 2.5).

2.3.3. Condiciones microclimáticas de la planta

El análisis de las condiciones microclimáticas de las plantas cerca de la base del tronco (10 cm por encima del nivel del suelo) y cerca de la parte superior o tope (100 cm por encima del nivel del suelo) de las copas de vid en ED reveló que durante el día no había gradiente vertical de temperatura. Mientras que durante la noche la base de la planta experimenta las temperaturas más bajas, situación que conduce a una AT más alta en la base que en la parte superior de la planta (Tabla 2.2A). Este patrón fue similar en los viñedos de MZA y WA. Sin embargo, las diferencias fueron mayores en MZA, con un gradiente de temperatura nocturna de -2,03 °C entre la base y el tope, y una diferencia AT de 3,93 °C en promedio para el periodo evaluado.

Tabla 2.2. Caracterización del microclima de plantas en MZA y WA durante el ED. A) Diferencias térmicas del aire día y noche y TA entre tope (T_{tope}) y base (T_{base}) del tronco. B) Diferencias térmicas del aire diurno y nocturno y TA entre tierra (T_{base}) y por debajo del suelo (T_{suelo}). r^2 corresponde al coeficiente de determinación y p al valor de significancia estadística. ns indica un valor $p > 0.05$.

2.2.A. Gradiente vertical en el aire

	MZA			WA		
	Día	Noche	AT	Día	Noche	AT
T_{tope}	12,6 ± 0,3	3,5 ± 0,2	17,1 ± 0,4	6,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	10,7 ± 0,5
T_{base}	13,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	21,0 ± 0,4	6,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	11,9 ± 0,5
r^2	0,61	0,81	0,31	0,68	0,72	0,08
p	ns	< 0,0001	< 0,0001	ns	0,035	ns

2.2.B. Gradiente vertical en el suelo

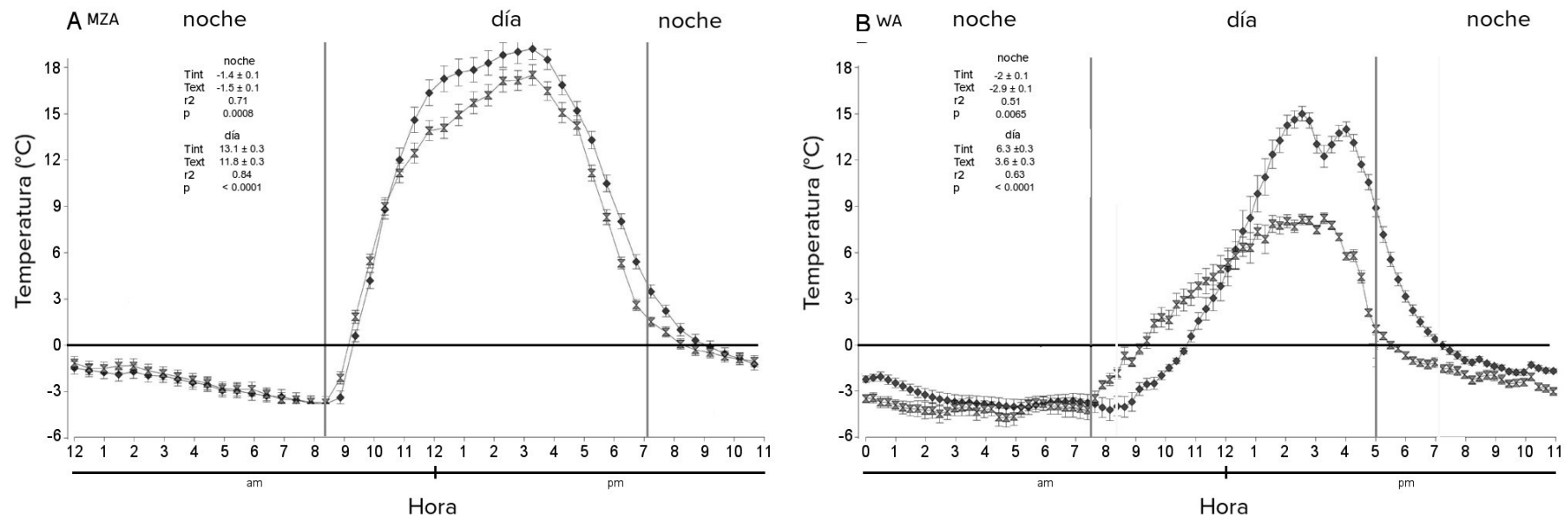
	MZA			WA		
	Día	Noche	AT	Día	Noche	AT
T_{base}	7,2 ± 0,24	4,8 ± 0,09	7,4 ± 0,63	7,4 ± 0,14	5,8 ± 0,27	6,5 ± 0,94
T_{suelo}	12,1 ± 0,24	2,1 ± 0,9	19,2 ± 0,63	11,9 ± 0,14	2,7 ± 0,27	17,3 ± 0,94
r^2	0,65	0,84	0,79	0,73	0,68	0,65
p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Las temperaturas del suelo también fueron significativamente diferentes de las temperaturas registradas en la base de la planta (Tabla 2.2B). En este caso, se obtuvieron resultados similares en MZA y WA, siendo el suelo más frío que el aire cerca de la base del tronco (o cuello de la planta) durante el día ($T_{\text{base}} - T_{\text{suelo}} = -4,87\text{ °C}$ y $-4,49\text{ °C}$ en MZA y WA, respectivamente) y más caliente durante la noche ($T_{\text{base}} - T_{\text{suelo}} = 2,71\text{ °C}$ y

3,13 °C en MZA y WA, respectivamente). Un efecto similar también se observó en la AT, donde el suelo mostró variación diurna de temperatura menos significativa que el aire cerca de la base del tronco ($TA_{base}-TA_{suelo} = -11,82$ y $-10,84$ °C en MZA y WA, respectivamente).

También se observaron diferencias significativas entre las temperaturas dentro (T_{int}) y fuera (T_{ext}) del tronco de la vid con una respuesta similar en ambos sitios (Figura 2.6). Mientras T_{int} era ligeramente más alta que T_{ext} durante la noche, durante el día el tronco estuvo más caliente que el aire. Esta diferencia nocturna fue de 1,3 °C en MZA y 2,7 °C en WA. Por otra parte, se observó que al amanecer, la temperatura del aire circundante aumentaba más rápidamente que el tronco, pero a mediodía la temperatura del tronco era mayor que la del aire. Este patrón se mantuvo hasta alrededor de las 8:00 pm, momento desde el cual T_{int} y T_{ext} se hicieron similares.

Figura 2.6. Caracterización microclimática de un día promedio de las temperaturas internas y externas de los troncos de vid durante la estación de dormición. Cambio en la temperatura diurna interna del tronco (T_{int} ; \blacklozenge) y aire cercano al tronco (T_{ext} ; \blacktriangle) en un día promedio durante la estación de dormición en Mendoza, Argentina (MZA; A) y Washington, USA (WA). Las barras representan la desviación estándar ($n = 3$ plantas) medida durante 15 días en agosto de 2013 en MZA y durante 6 días en febrero de 2012 en WA. Las mediciones térmicas fueron de carácter diario.



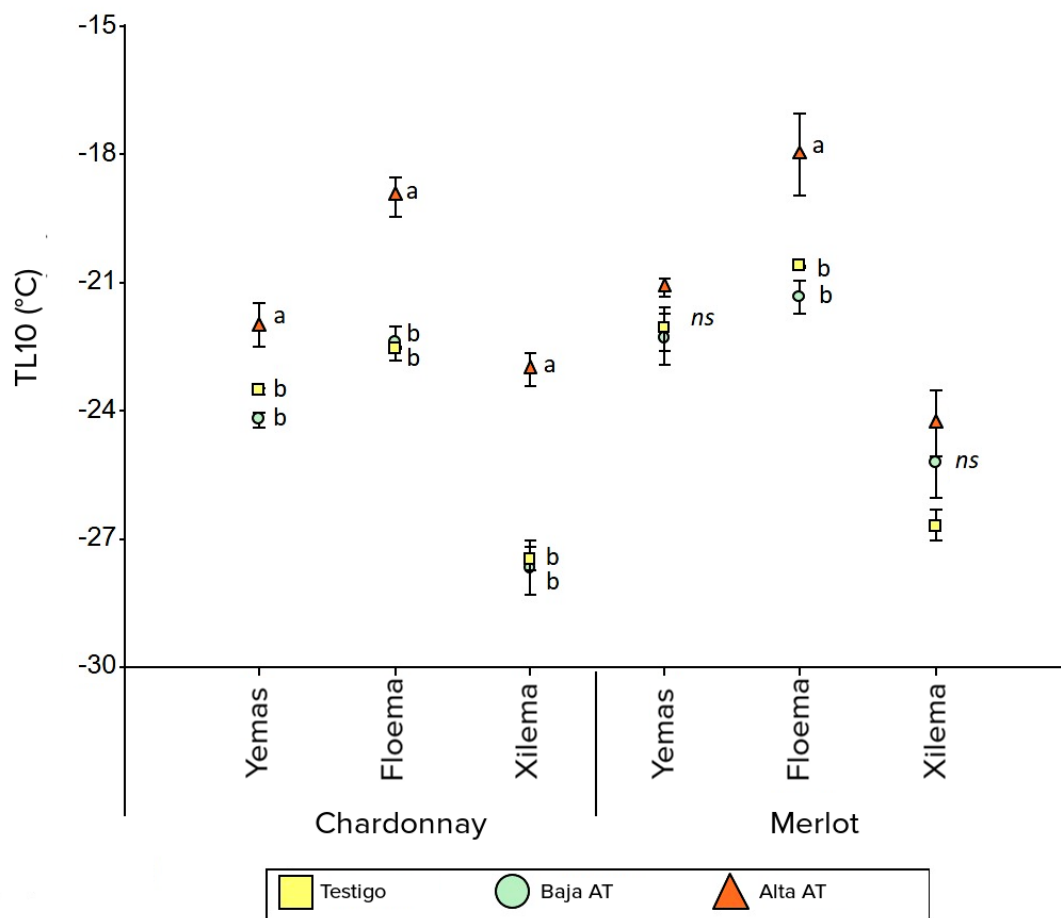
2.3.4. Efecto de la AT en las tasas de desaclimatación de yemas y distintos tejidos de sarmiento

Con el fin de determinar si la desaclimación de tejidos puede ser inducida por diferencias en AT, los entrenudos y yemas de sarmiento aclimatados en condiciones de campo fueron sometidos a una baja AT (7 °C) durante 24 h, alto AT (30 °C) durante 24 h y un testigo (sin tratamiento térmico) en dos variedades de *Vitis vinifera*, Chardonnay y Merlot.

El LT₁₀ de las yemas de la var. Chardonnay y los tejidos internodales no difirieron entre el control y el tratamiento de baja AT. Por el contrario, hubo un efecto significativo del tratamiento de alta AT. El tejido que fue más vulnerable a la desaclimatación fue el xilema, seguido por el floema, finalmente la yema (Tabla 2.3).

En Merlot, tanto yemas como xilema no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento de alta AT llevó a la pérdida de RF en el floema en el cv Merlot (Figura 2.7, Tabla 2.3).

Figura 2.7 Temperaturas letales (TL₁₀) en yemas de vid y tejidos de sarmiento después de diferentes tratamientos térmicos antes de una simulación de congelación en var. Chardonnay y var. Merlot. Las yemas y las secciones del entrenudo se sometieron a dos condiciones de AT: baja (7 °C TA) (●) y alta (30 °C TA) (▲) durante 24 h seguido de congelación controlada. A los testigos no se les aplicó el tratamiento térmico (□) antes de la congelación controlada. Los símbolos corresponden a las medias y las barras a las desviaciones estándar (entrenudo: n = 8; yema: n = 20. Los símbolos con letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de DGC, p <0,0001).



En la tabla 2.3 representa las diferencias entre los valores de resistencia al frío (TL10) entre los tratamientos más extremos, el de Alta AT y el testigo a los fines de observar la magnitud de la perdida de resistencia por efecto del tratamiento. En el caso de los tratamientos que no registraron diferencia estadística entre ellos, no se consignó la diferencia en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Diferencia entre $LT10_{Alta\ AT}$ y $LT10_{testigo}$. ns representa no significancia estadística

Tejido	Chardonnay	Merlot
Yema	-1.54	ns
Floema	-3.55	-2.62
Xilema	-4.43	ns

2.4. Discusión

La mayoría de la información sobre RF en viñas en MZA actualmente se extrapola a partir de información generada de diferentes regiones del HN, debido a que no hay información local. En WA, sin embargo, los daños por frío son un fenómeno común con graves consecuencias económicas. De hecho, se han generado diferentes modelos para predecir el daño por frío durante el ED (Ferguson et al. 2011, 2014). Estos modelos se aplicaron en regiones donde la temperatura permanece relativamente baja y estables durante la ED (Proebsting y Ahmedullah 1980, Jiang y Howell 2002). Sin embargo, los mismos modelos no presentaron buenos resultados bajo las condiciones climáticas del MZA (Gonzalez Antivilo, resultados no publicados), lo que sugiere que el modelo no captura aspectos importantes de la variación climática entre las regiones en estudio y esto determina la importancia de generar información local para comprender las causas del daño por congelamiento en MZA.

Tanto MZA como WA son regiones vitivinícolas de importancia mundial y comparten algunas similitudes climáticas, cultivares de uva, así como el riego, las enfermedades y el manejo de los viñedos. Geográficamente, ambos sitios tienen en común la proximidad a las montañas, episodios de viento tipo Föhn, índices bioclimáticos similares según Köppen-Geiger (frío, árido y desierto) y precipitación anual de alrededor de 200 mm (Tabla 2.1). Además, ambas regiones muestran síntomas de daños por heladas en vides. Sin embargo, una comparación de los registros meteorológicos de 10 años de ambas regiones reveló diferencias contrastantes con una influencia potencial sobre la fisiología de plantas de *Vitis sp.*

El uso de T_{media} está ampliamente aceptada para comparar las características climáticas entre las regiones y su asociación con parámetros biológicos (por ejemplo, fotosíntesis,

RF). De acuerdo con este índice bioclimático, el ED de MZA es $\sim 5^{\circ}\text{C}$ más cálida que en WA. Sin embargo, al profundizar los parámetros restantes que definen las características térmicas, es posible generar otra interpretación durante el ED de ambos sitios: i) a pesar de las diferencias de latitud, hay ligeras diferencias en la T_{\min} media ($<1,5^{\circ}\text{C}$); ii) el T_{\max} medio es considerablemente mayor en MZA que en WA, alcanzando diferencias máximas durante la ED intermedio con valores de 12°C iii) La AT media en MZA es de $\sim 16^{\circ}\text{C}$ con una alta variación interanual a lo largo de todo el período ED, mientras que en WA, la AT alcanza un mínimo durante la ED intermedia ($\sim 6^{\circ}\text{C}$); iv) Además, en WA, hay algunos días con T_{\max} que no exceden los 0°C , situación que en MZA es extremadamente rara (Figura 2.4). Teniendo en cuenta la vulnerabilidad de *Vitis vinifera* a la desaclimatación inducida por las altas temperaturas intempestivas (Ferguson et al. 2011, 2014), estas diferencias climáticas podrían ocasionar daños ocasionales al frío incluso en viñedos de MZA.

La presencia de las barreras montañosas produce una influencia considerable en el clima regional, afectando profundamente en el AT estacional, la precipitación y la continentalidad (Thompson et al. 1977). Sin embargo, la magnitud del efecto causado por estas barreras depende de las características orográficas en cada caso. En este sentido, de la Cordillera de Los Andes constituyen un formidable obstáculo para los vientos del Océano Pacífico, que consta de más de 3 veces la altitud media y el doble de ancho que la Cordillera de las Cascadas (Tabla 2.1). Por otra parte, mientras que la Cordillera de Los Andes es un sistema ininterrumpido de la montañas, las Cascadas está interrumpida por la garganta del río Columbia, mostrando un índice más bajo de continentalidad que MZA (Gedalof 2005, WRCC 2013).

Ambas regiones, MZA y WA, se ven afectados por dos centros semi-permanentes de alta presión situados por encima de los océanos Pacífico Sur y Norte, respectivamente. En las regiones costeras (lado barlovento) estos centros de presión son responsables de inviernos húmedos y veranos secos (Mass y Dotson 2010; Ancapichún y Garcés-Vargas 2015). Durante ED, esos anticiclones empujan los vientos hacia las cordilleras. Como el viento sube las laderas del lado de barlovento de la cordillera, el aire húmedo pierde agua en forma de lluvia o nieve. Sin embargo, la altitud de las cordilleras es capaz de modificar la distribución de las lluvias en ambos lados de las montañas (Bianchi y Yáñez 1992). En el caso de la Cordillera de Los Andes, su altitud (~ 4000 msnm en promedio en la región de estudio) favorece la acumulación de lluvia y nieve en el lado de barlovento (República de Chile), secando el aire y evitando la precipitación en las llanuras bajas de MZA (Bianchi y Yáñez 1992). Sin embargo, la relativa baja altitud de la Cordillera de las Cascadas (~ 1000 msnm en promedio en la zona de estudio) y su interrupción por el río Columbia permite que las nubes sobrepasen las colinas hacia el oeste, favoreciendo la ocurrencia de lluvias de invierno a ambos lados de las montañas (Massa y Dotson 2010). Como consecuencia de estas características, el cielo soleado es frecuente en MZA durante el ED intermedia ($\sim 100\%$), mientras que en WA la frecuencia de días soleados es significativamente menor ($\sim 25\%$).

Otra consecuencia del paso de los vientos a través de las montañas es el "efecto Föhn". Este fenómeno es causado por la compresión adiabática que sufren los vientos cuando descienden las pendientes de las montañas, causando un incremento de temperatura y una especie de "veranito invernal" intempestivo seguido de un fuerte evento de heladas por irradiación. Cuanto más pronunciada es la altitud, más fuerte, cálido y seco será el viento (Norte y Simonelli 2016). En el caso de los vientos *Zonda* en MZA, su

ocurrencia se distribuye de mayo a noviembre, con casi el 50% de su incidencia dentro de los meses de julio-agosto. Además, la probabilidad de que este viento sea severo ($> 10^{\circ}\text{C}$ de salto térmico) y de larga duración (hasta 3 días) sólo es alta en la ED tardía (Caretta et al. 2004). Por el contrario, los vientos de *Chinook* en WA rara vez ocurren durante el invierno, y producen un efecto térmico relativamente pequeño debido a la baja altitud de las Cascadas (Burrows 1940). Por lo tanto, los Andes son una barrera climática mucho más importante para MZA (Bianchi y Yáñez 1992), que las Cascadas para WA, donde sus efectos son menos marcados y se muestran más influenciados por el Océano Pacífico (Massa y Dotson 2010).

La temperatura y la HR son ambas variables ambientales estrechamente relacionadas; En consecuencia y dependiendo del grado de humedad del aire es la cantidad de energía que se requiere para calentarla o enfriarla, así, un aire saturado de humedad requiere más energía para elevar su temperatura (calor específico aire saturado: $0,43\text{ kcal / Kg }^{\circ}\text{C}$) comparado a un aire totalmente seco (aire seco térmico específico: $0,24\text{ kcal / Kg }^{\circ}\text{C}$). En MZA, la HR es bastante constante durante el ED ($\sim 60\%$) y con baja probabilidad de precipitación como lluvia o nieve, resultando con una AT muy alta (Figura 2.4B,C). Por otra parte, los vientos de *Zonda* tienen un alto poder desecante que reduce la HR a niveles inferiores al 30% (Norte y Simonelli 2016), siendo probablemente la principal causa de la alta variación interanual en la AT diaria observada en esta investigación (Figura 2.4C). Por el contrario, en WA la HR muestra un incremento progresivo que alcanza un valor más alto en el ED intermedia ($\sim 100\%$), lo que explica la AT baja observada allí durante ese periodo. De hecho, en algunos días las temperaturas máxima y mínima son casi iguales ($TA \approx 0$). En este sentido, nuestros resultados

sugieren que el pico de contraste de las situaciones climáticas entre MZA y WA coincide con el ED tardía, período en el que las vides son más susceptibles a la desaclimatación.

La temperatura del aire se registra en diferentes tipos de estaciones meteorológicas y con diferentes sensores. Una de las estaciones más tradicionales y empleadas en todo el mundo son las estaciones meteorológicas de Stevenson, creada en el siglo XIX y compuesta por diferentes sensores analógicos protegidos por un abrigo de madera blanca. Hoy en día esas estaciones están siendo reemplazadas por estaciones meteorológicas automáticas digitales con refugio de plástico blanco. Sin embargo, la temperatura es un parámetro muy variable y sensible, y depende de los sensores empleados, de las características constructivas del refugio, de la cercanía a los edificios, etcétera (Tarara et al. 2007; Menne et al. 2010). De hecho, pequeñas diferencias, tales como el tipo de pintura empleada, afectan los valores reales de temperatura de T_{\max} en 1,66 ° C y T_{\min} en 2,78 ° C (Fall 2011).

La literatura se refiere a que los datos térmicos registrados por diferentes tecnologías de sensores y materiales del refugio dependen del alcance geográfico y las preferencias del investigador. Las publicaciones relacionadas a la meteorología se basan comúnmente en datos generados por EMC (Giantomasi et al. 2009, Burgos 2010). Sin embargo, en los estudios biológicos que relacionan observaciones de organismos vivos con parámetros meteorológicos, es necesario emplear datos obtenidos por EMC cercanas a la región de estudio y/o por datos complementados con sensores instalados “in situ” como se aprecia en los trabajos de Hubácková (1996) o Echarte et al. (2010).

Cuanto mayor es la precisión requerida para una inferencia, más importante es la densidad de sensores y la proximidad a los organismos vivos en estudio. En este caso, la comparación de los registros de temperatura de los sensores instalados en el viñedo

y los del EMC más cercana (<500 m) en MZA y WA reveló que a pesar de que los datos de campo y EMC estaban correlacionados, en ambos casos observamos un sesgo significativo en el cual la EMC sobrestima la T_{\max} y subestima la T_{\min} . Por lo tanto, el valor de AT es más alto en el campo que el indicado por el EMC. Además, en casos particulares, los valores registrados por EMC difirieron marcadamente de la medición de campo (Figura 2.3). Resultados similares también se obtuvieron mediante el monitoreo de otras especies de plantas (Renaud y Rebetez 2009). Por lo tanto, aunque los registros de temperatura de EMC son útiles para describir las condiciones macroclimáticas de una región en particular, nuestros datos sugieren que para llegar a inferencias biológicas más precisas se recomienda la instalación de sensores “in situ” para entender las condiciones reales de temperatura a las que cuales están expuestas las plantas. Además, las mediciones de este parámetro tan importante tiene implicancias directas en el control activo de heladas, ya que permite el monitoreo de las temperaturas durante los eventos de congelación en tiempo real y así luego poder evaluar su relación con los daños.

En la escala de individuo, existe una variabilidad espacial en la resistencia a la congelación y el riesgo de la ocurrencia, desde el sistema radicular hasta la parte superior de la canopia (o lo que se a nombrado en este capítulo como tope; Charrier et al. 2011, 2015). Es ampliamente aceptado que hay un gradiente de temperatura del aire, y que la temperatura más baja se encuentra cerca del suelo (Leuning y Cremer 1988, Jordan y Smith 1994, Blennow 1998, Battany et al. 2012). Sin embargo, hay escasa información sobre la magnitud de este gradiente y sus implicaciones en los procesos de aclimatación y desaclimatación durante el ED. Nuestros resultados sugieren que en MZA la base de la planta está sujeta a una alta AT (Tabla 2.4A). Este fenómeno podría

conducir a la desaclimatación, dejando la base del tronco más expuestas a las lesiones por frío durante una noche inusualmente fría. Según nuestras observaciones, el daño a la base del tronco es uno de los síntomas más comunes cuando existe daño por frío en MZA, por lo que podría estar relacionado con una desaclimatación diferencial entre diferentes partes del tronco de la vid. Por el contrario, en WA la casi ausencia de este gradiente de temperatura podría atribuirse a la mayor HR durante el invierno.

Las temperaturas en la base del tronco también tuvieron mayor T_{\max} y por consiguiente mayor AT que el aire circundante. La capacidad del tronco para retener energía está relacionada con su masa, lo que genera una inercia térmica de modo que los troncos comienzan a calentarse o enfriarse más tarde que el aire (Figura 2.6). Un resultado similar ha sido observado por Paroschy et al. (1980). Aunque la temperatura del tronco es generalmente mayor en MZA que en WA, la presencia de nieve en WA puede producir un efecto de albedo, induciendo una mayor ganancia térmica durante el día (Figura 2.6).

Aunque la raíz es el órgano más susceptible al daño por congelación (Okamoto et al. 2000), el suelo tiene inercia térmica que actúa como un amortiguador o “buffer” (Tabla 2.2B). Esta capacidad protege la raíz de las disminuciones excesivas de temperatura. Además, permite el rebrote de los brotes latentes en la parte inferior del tronco. Por eso es un síntoma característico en plantas con daños masivos por helada (Zabadal et al. 2007).

Pocas investigaciones estiman la tasa de desaclimatación probando diferentes combinaciones de temperatura y períodos de tiempo. Estas fuentes determinan que la RF depende de la especie, las variedades y la temperatura a las que se someten las plantas (Pagter y Williams 2011, Eagles 1989). Así, en *Vitis sp.* se demostró que con

tratamientos térmicos de 14 °C durante 3 semanas (var. ThompsonSeedless, Rubio et al. 2016) y 25/20 °C (temperatura del día/temperatura de la noche) durante 4 días (var. Chardonnay, Cragin et al. 2017) se pueden observar tasas de desaclimación diaria de 2 °C aproximadamente. Nuestros resultados indican que la AT alta puede conducir a tasas de desaclimación similares en un día, pero a mayores valores AT que las utilizadas en las publicaciones anteriormente citadas. Por lo tanto, una AT de 30 ° C fue lo suficientemente fuerte como para cambiar el estado RF en todos los tejidos en ambas variedades evaluadas, mientras que una AT de 7 °C no alteró la RF (Figura 2.7). Aunque var. Chardonnay tenía una RF inicial más alta, se mostró más susceptible a la desaclimatación que var. Merlot, que en principio era aparentemente más susceptible.

Vitis sp presenta diferentes tasas de desaclimación según la etapa (temprana, intermedia o tardía). De esta manera, se ha observado que durante el ED tardía la desaclimatación es más rápida que durante las etapas anteriores (Sakai y Larcher 1987, Levit 1980, Steffen et al. 1989). Por lo tanto, las fluctuaciones de temperatura (incluyendo AT alta) durante el final del invierno o períodos prolongados de temperaturas extratemperales altas pueden conducir a la desaclimatación, haciendo que las plantas sean vulnerables a los daños causados por las rápidas caídas de temperatura (Fennell 2004, Gu et al. 2002).

Según nuestros resultados, las plantas sometidas a AT alta, como el caso de MZA, probablemente no podrían alcanzar la máxima capacidad de aclimatación debido a pequeños ciclos diarios de aclimatación-desaclimación. Además, Haynes et al. (1992) demostraron que hay más riesgo de daño si después de un evento frío, la temperatura experimenta un rápido aumento. Una situación como esta es común en MZA durante la ED tardía donde los valores medios de AT son de 16 °C, pero especialmente cuando

ocurren vientos *Zonda* que podrían generar saltos térmicos adicionales de casi 10 °C, y la AT diaria podría alcanzar hasta 26 °C.

Por último, hoy en día es común estudiar el cambio climático global desde el punto de vista de la EC. De hecho, Friend et al (2011) describieron el evento de helada de primavera puede resultar en pérdidas sustanciales de rendimiento de la vid por daño en inflorescencias y brotes. Sin embargo, de acuerdo con las predicciones actuales, se esperan eventos extremos y abruptos por ondas de calentamiento y enfriamiento, además de vientos Föhn extremos durante ED (Bernstein et al. 2008) y podría inducir a una pérdida de RF (Farrell 2010, Easterling et al. 2000). Estas situaciones ambientales podrían dejar a las plantas en un estado más vulnerable frente a las heladas. Además, el proceso de desaclimatación ocurre a un ritmo más rápido que la aclimatación, esto se cumple especialmente en la etapa de ED tardía (Kalberer et al. 2006). Por lo tanto, la determinación de la tasa de desaclimatación de los cultivares de vid es necesaria para identificar áreas más aptas para los cultivos.

2.5. Conclusiones

La comparación de las condiciones climáticas entre MZA y WA reveló condiciones térmicas contrastantes, pero sin embargo, las condiciones en ambas regiones son capaces de inducir daños por congelación en los viñedos. Una de las diferencias climáticas más relevantes entre MZA y WA es la AT diaria que es mucho más alta en MZA. Además, la incidencia de los vientos *Zonda* durante el ED en MZA produce olas calientes fuera de temporada que son seguidas por eventos de congelación y que

potencialmente aumentan la incidencia de lesión por frío. La ausencia de datos de temperatura registrados en el campo representa un problema, ya que este estudio demostró que la AT de campo tiende a ser mayor que la registrada por EMC. Además, demostramos que el entorno térmico alrededor de las plantas también es variable. La base de los troncos de vid fue la parte más vulnerable porque se somete a la mayor variación de temperatura, mientras que las raíces tienden a ser protegidas por el suelo. Sugerimos que esta es la razón principal de los rebrotes desde abajo del suelo observado en campos en plantas afectadas por daños por congelación. Por último, hemos demostrado que es posible una desaclimatación al frío en un corto período de tiempo, y que esto depende de la AT.

CAPÍTULO 3

Los parámetros de la historia térmica como motores de los cambios en la fisiología y resistencia al frío de troncos de plantas jóvenes de *Vitis vinifera* var. Malbec durante el invierno

3.1. Introducción

La provincia de Mendoza (Argentina; MZA), situada entre los 32 ° y 36 ° de latitud sur, es la región productora de uva más importante de todo el continente sudamericano, alcanzando unas 150.000 ha (Canziani y Scarel 2015). Su macroclima es seco y templado con un alto índice de continentalidad debido a la proximidad con la Cordillera de Los Andes. Esto da como resultado una alta amplitud térmica en el ciclo día/noche pero también entre las diferentes estaciones del año (Gonzalez Antivilo et al. 2017). Además, durante el invierno y la primavera, se produce un viento tipo föhn, seco y cálido, llamado *Zonda* (Norte y Simonelli 2016). Después de la ocurrencia de este viento, suele venir acompañado de eventos de heladas generalizadas, causando lesiones en las plantas frutales y reduciendo los rendimientos cada año (Caretta et al. 2004).

MZA es una región desértica con menos de 200 mm/año de precipitación en forma de lluvia. Por lo tanto, los cultivos se riegan con el deshielo de la nieve de la Cordillera de Los Andes, lo que lleva a que los cultivos se concentren en cuatro pequeños oasis productivos con diferentes características agroclimáticas, que se dan a llamar según su ubicación geográfica como oasis Norte, Este, Central y Sur (Figura 3.5A; Gonzalez et al. 2009; DACC 2015-2016). Además, cada oasis presenta peculiaridades microclimáticas, particularmente definidas por la topografía, el tipo de suelo y la disponibilidad de agua. En MZA se cultivan más de veinte variedades de vid, todas ellas *Vitis vinifera*, siendo la más emblemática Malbec (poco cultivado en otros países; Mb) y que ha experimentado un vertiginoso aumento en los últimos 15 años, duplicando la superficie y alcanzando un área cultivada real de 34.000 ha distribuidas en todos los oasis de MZA (INV 2016).

La vid es una planta frutal trepadora, perenne, adaptada a climas templados, capaz de sobrevivir a bajas temperaturas durante el invierno. Este proceso se llama resistencia al frío (RF) y es un proceso activo, dinámico y complejo con adaptaciones bioquímicas y fisiológicas (Weiser 1970, Chen y Li 1977, Shaulis 1971, Wisniewski et al. 1996). Clásicamente, se divide en tres etapas: i) la *aclimatación* caracterizada como un período de transición desde un no resistente a otro totalmente resistente; ii) mediados de invierno, caracterizado como un período de RF máxima; y iii) *desaclimatación*, caracterizada como un período de transición desde el estado completamente resistente a otro no resistente seguido del crecimiento activo (Howell 2000). Además, RF se considera como una curva en forma de U con un nivel máximo de resistencia (MHL) considerado como constante que es diferente en cada año (Proebsting et al. 1980). Por lo general, la RF se mide como la temperatura letal requerida para matar el 50% de los tejidos (TL₅₀).

Este mecanismo fisiológico puede lograrse mediante diferentes estrategias de las plantas, que pueden ser, la tolerancia y/o escape al congelamiento, ambas estrategias definidas por Levitt (1980). El escape a la formación de hielo está relacionada con algunos compuestos bioquímicos crioprotectores que tienen la función de reducir el punto de congelación del citoplasma y así el agua permanece sobre-enfriada sin congelarse. Algunos compuestos que se informaron como crioprotectores son algunos azúcares simples y aminoácidos libres (Currle et al. 1983, Fennell 2004, Guy 1990, Pierquet y Stushnoff 1980). Por otra parte, la deshidratación de los tejidos también se ha citado como otro mecanismo para evitar la formación de hielo. La tolerancia a la congelación, por su parte, se define como la capacidad de tolerar el hielo en el tejido

apoplástico (Levitt 1980). La formación de hielo extracelular es letal en algunas especies (Ruelland et al. 2009).

La vid tiene ambos mecanismos activos. En troncos, la RF se basa en el superenfriamiento y en la tolerancia (Burke et al. 1976, Andrews et al. 1984, Badulescu y Ernst 2006), y estos dos mecanismos ocurren simultáneamente. Esto se ha podido comprobar por el método de análisis térmico diferencial (DTA) (Mills et al. 2006). La eficacia de estos mecanismos depende de las temperaturas, las especies e incluso del cultivar en cuestión y su edad, lo que significa que existe un potencial genético de RF pero que es modulado por otros factores intervinientes (Keller 2010). Entre las vides, se ha reportado que *V. vinifera* no es particularmente resistente al frío y que sufre daños por congelación durante el invierno, contrariamente a lo observado en vides de origen americano, con mayores umbrales de resistencia al frío (Londo y Kovaleski 2017).

Los cambios macroclimáticos pueden afectar las condiciones invernales. Según las proyecciones del IPCC (2013), se espera un aumento de las temperaturas de entre 2 y 4 °C para los próximos 100 años en todo el mundo. MZA ha sido incluido en este escenario, de hecho ha habido un aumento en las temperaturas mínimas promedio de invierno considerando los últimos 50 años (Deis et al. 2015). Otras predicciones también indican que las contingencias climáticas serán más extremas, incluidos los eventos de olas frías y calientes (INV 2014). Las plantas vivirán en un ambiente más fluctuante, y por ende más riesgoso (Londo y Kovaleski 2017). Esto se corrobora con el hecho de que en MZA, durante la última década se han registraron inviernos duros con temperaturas absolutas muy bajas y heladas tardías, que afectaron a varias áreas productivas (Dirección de Agricultura y Contingencias Climáticas, DACC). Para ilustrar esto, en los

últimos dos ciclos agrícolas se registraron severos eventos de congelamiento en gran parte del territorio provincial, tanto durante la estación de dormición (ED; con temperaturas mínimas absolutas menores a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) como en la de crecimiento (EC; con temperaturas mínimas absolutas menores a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$). En coincidencia, el INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura 2017) indicó pérdidas de cosecha de uva de hasta 30% para las temporadas 2015-2016 y 2016-2017. Por lo tanto, dado que las lesiones por frío afectan la sustentabilidad del viñedo y los rendimientos, es completamente necesario ampliar la información local para ayudar a los productores, empresas y las políticas gubernamentales a zonificar las áreas cultivadas existentes por variedad o elegir la mejor combinación entre variedad y zona para implantar un nuevo viñedo.

El objetivo de este estudio fue determinar si el estado de RF en Mb clon Pedriel puede verse afectado por su historia térmica durante la ED en MZA. Nuestra estrategia consistió en someter a plantas de un mismo clon y cultivar bajo dos ambientes térmicos contrastantes y evaluar la evolución del estado RF a fin de establecer la relación entre el proceso de aclimatación-deaclimatación y los diferentes parámetros térmicos. Con esto, intentamos establecer qué parámetros explican mejor esta relación. Además, procuramos revelar el momento de la ED en la que la historia térmica puede influir en el mantenimiento del estado de RF. Esta información podría estar vinculada a las características agroecológicas de cada oasis productivo de MZA en el marco de las predicciones de cambio climático. Finalmente, medimos la evolución de los diferentes parámetros fisicoquímicos involucrados en la aclimatación de RF para determinar cuál es el más influyente en este proceso.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. - Ensayo a campo

Localización del ensayo y material vegetal

El ensayo se llevó a cabo durante la ED (marzo a septiembre) de los años 2012 (A-1), 2013 (A-2) y 2016 (A-3). Durante los dos primeros años de medición el ensayo se localizó en Luján de Cuyo, MZA (33° 0'29.67"S y 68°52'20.95"O), mientras que el último año de medición se realizó en el Godoy Cruz, MZA (32°55'6.69"S y 68°50'32.82"O).

Material vegetal

Para cada año de ensayo se utilizaron 200 plantas de Malbec clon Perdriel de dos años de edad a pie franco (sin injertar) en macetas de 3 litros (Vivero Mercier). El sustrato utilizado fue una mezcla de 50 % tierra, 25 % arena y 25 % perlita. Durante la EC previa al inicio de los tratamientos, las plantas se regaron 2 veces a la semana y se hicieron las aplicaciones de agroquímicos correspondientes para control de oidio (azufre y systane) y arañuelas (dimetoato) con el fin de mantener la canopia en excelente estado hasta la caída natural de hojas, luego de la cual comenzó el ensayo. A partir ese momento, entrada la ED, las plantas se regaron 1 vez cada 2 semanas con medio litro de agua por maceta.

Diseño experimental

En cada una de las 3 temporadas de ensayo, la totalidad de las plantas (200) se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales de campo desde el mes de febrero a mayo (EC). A partir del mes de junio hasta el mes de septiembre las plantas fueron sometidas a dos tratamientos térmicos diferentes denominados Invierno natural (N_w = Natural Winter) e Invierno calentado artificialmente (AW_w = Artificial Warm Winter). El primero, considerado como testigo, consistió en dejar las plantas a las condiciones ambientales de campo. Por su parte el segundo tratamiento consistió en modificar las temperaturas mediante la utilización de un invernáculo y un sistema de calefacción. Durante el primer año ensayado (A-1) se logró un calentamiento durante el día, pero no se utilizó ningún tipo de calefacción nocturna. Sin embargo, el año A-2 se utilizó un pequeño calefactor eléctrico de 1000 watt/hora (marca hexahome) colocado al metro de altura durante la noche. Mientras que el último año de medición, A-3, se utilizó un calefactor a gas de 3000 cal/hora dispuesto a 10 cm del suelo. En los años que se calentó durante la noche se comenzó luego de una hora del anochecer (aproximadamente 20 hs). El invernáculo tuvo unas dimensiones de 2 m x 3 m en los dos primeros años, mientras que en último se utilizó uno de 3 m x 4 m. En todos los casos se recubrió con plástico cristal de 200 μ m con protección UV.

Se realizaron muestreos cada 15 días aproximadamente desde a partir junio. En cada fecha de muestreo se seleccionaron al azar 8 plantas por tratamiento con un muestreo del tipo destructivo (sin reposición). En el año A-1 se realizó un bloqueo por área foliar total de las plantas pero no se evidenció efecto del bloque en el análisis estadístico por lo que no se volvió a realizar el mismo en los siguientes años. Las plantas se etiquetaron

con números consecutivos para luego ser sorteadas por la función de azar de Libreoffice calc.

Fenología

A partir del mes de junio se registraron los datos fenológicos cada 3 días en 8 plantas por tratamiento seleccionadas al azar y etiquetadas específicamente para este fin, evitando ser seleccionadas en el muestreo destructivo. Se simplificó la fenología solamente a 3 estadios: yema cerrada o invernante (estado A según fenología Baggiolini 1952), yema hinchada-punta verde (estado B-C) y yema con primera hoja expandida o brotada (estado D; ver anexo 3 capítulo 4). Luego de la brotación se midió el largo de los brotes en cm con la misma frecuencia.

Seguimiento térmico

En A-1 y A-2, el seguimiento térmico se realizó con sensores IButton (Thermochron DS1922L-F5 iButton temperature loggers, Maxim Integrated, San Jose, CA, con un rango de medición de -40 to +125 °C, y una precisión ± 0.5 °C). Mientras que el A-3 se utilizó un equipo logger Arduino mega 2560 integrado con sensores DS18B20 desarrollado por IANIGLA-CONICET. Se dispusieron 2 sensores por tratamiento en todos los años analizados.

Índices bioclimáticos

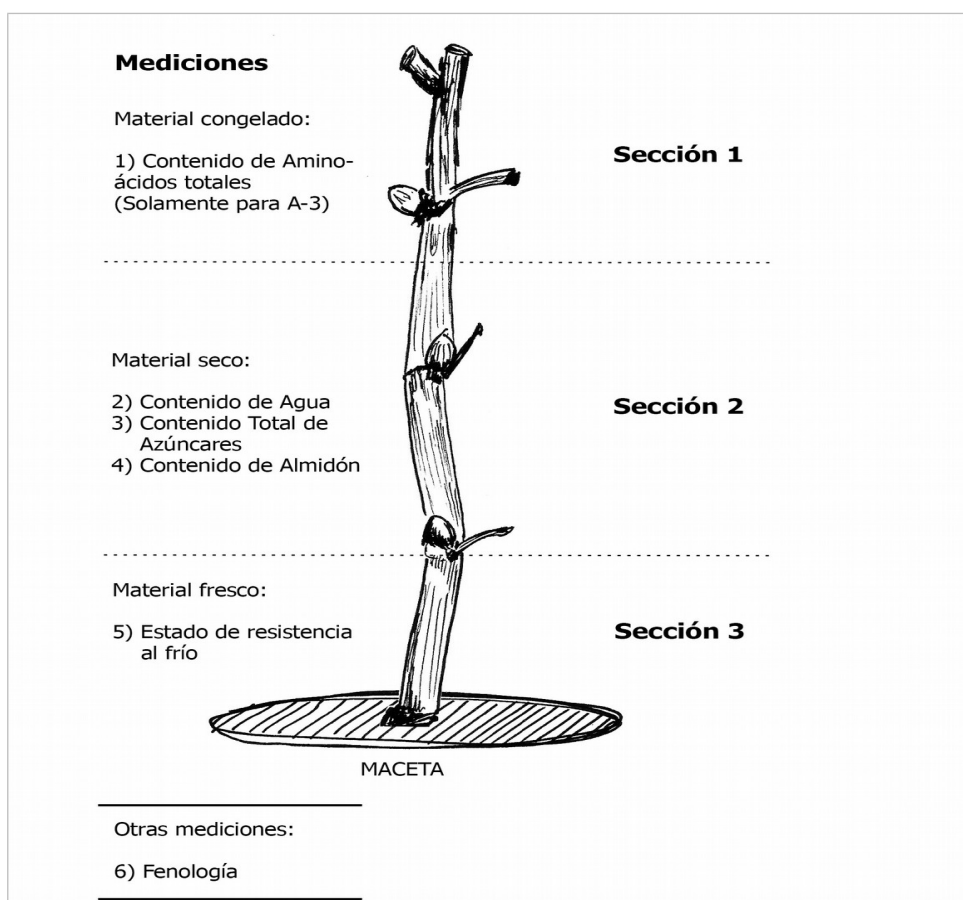
Para caracterizar y comparar los ambientes ecológicos generados por los tratamientos sobre la fisiología de la vid durante la ED (desde el 1 de abril hasta el 31 de agosto) de A-1, A-2 e A-3, se calcularon dos índices ecológicos según Deis et al (2015): i) ΣT_{min} , que corresponde a la sumatoria de T_{min} diaria durante el período de la ED y ii) $n^{\circ} D < -3$, que se refiere a la cantidad total de días que alcanzan temperaturas iguales o inferiores a $-3^{\circ}C$ durante la ED. Además, estos índices se compararon con registros históricos de diferentes oasis productivos de la provincia MZA.

3.2.2. Laboratorio*Preparación de muestras*

En cada fecha de muestreo el trabajo se inició cerca de la hora de la salida del sol para evitar cualquier desaclimatación. Se cortó el tronco en la zona del cuello, descartando los brotes del año y yemas, y se colocó cada uno en una bolsa plástica hermética junto con un papel mojado para evitar la deshidratación del tejido. Se etiquetó y se embalgó en una caja de telgopor para ser llevadas al laboratorio. Allí, los troncos se separaron en 3 partes iguales para los distintos análisis. Siempre se utilizó la parte superior para la medición de Malondialdehído (no presentado en este trabajo, pérdida de muestras por descongelado), la segunda para el contenido de agua (CA), contenido de azúcares solubles totales (AzST) y almidón y la parte basal para la medición de resistencia al frío (RF). Sin embargo en el año A-3 se decidió incorporar la medición de aminoácidos totales (AmLT) para lo cual se decidió utilizar la primera parte como se puede observar en la Figura 3.1. Para la medición de aminoácidos totales la porción del tronco se

congeló con nitrógeno líquido inmediatamente después de cortado, se etiquetó y llevó a freezer a -20 °C. A la sección 2 se le tomó el peso inicial, y luego se llevó a estufa a 60 °C por 2 días, luego de lo cual se le tomó el peso nuevamente, se etiquetó y guardó. Las secciones 1 y 2 se molieron con un molino a cuchilla marca Resch Z200 (Alemania). El procesamiento de la tercera sección utilizada para determinar la RF, se describe en el siguiente punto.

Figura 3.1. División en secciones de plantas de dos años *Vitis vinifera*. Las plantas mantenidas bajo condiciones de N_w y AW_w fueron divididas en tres partes: i) la sección 1, para determinación bioquímica del contenido total de aminoácidos libres; ii) la sección 2, destinada a la determinación bioquímica del contenido total de azúcar, almidón y agua; iii) Sección 3, destinada a evaluar el estado de RF.

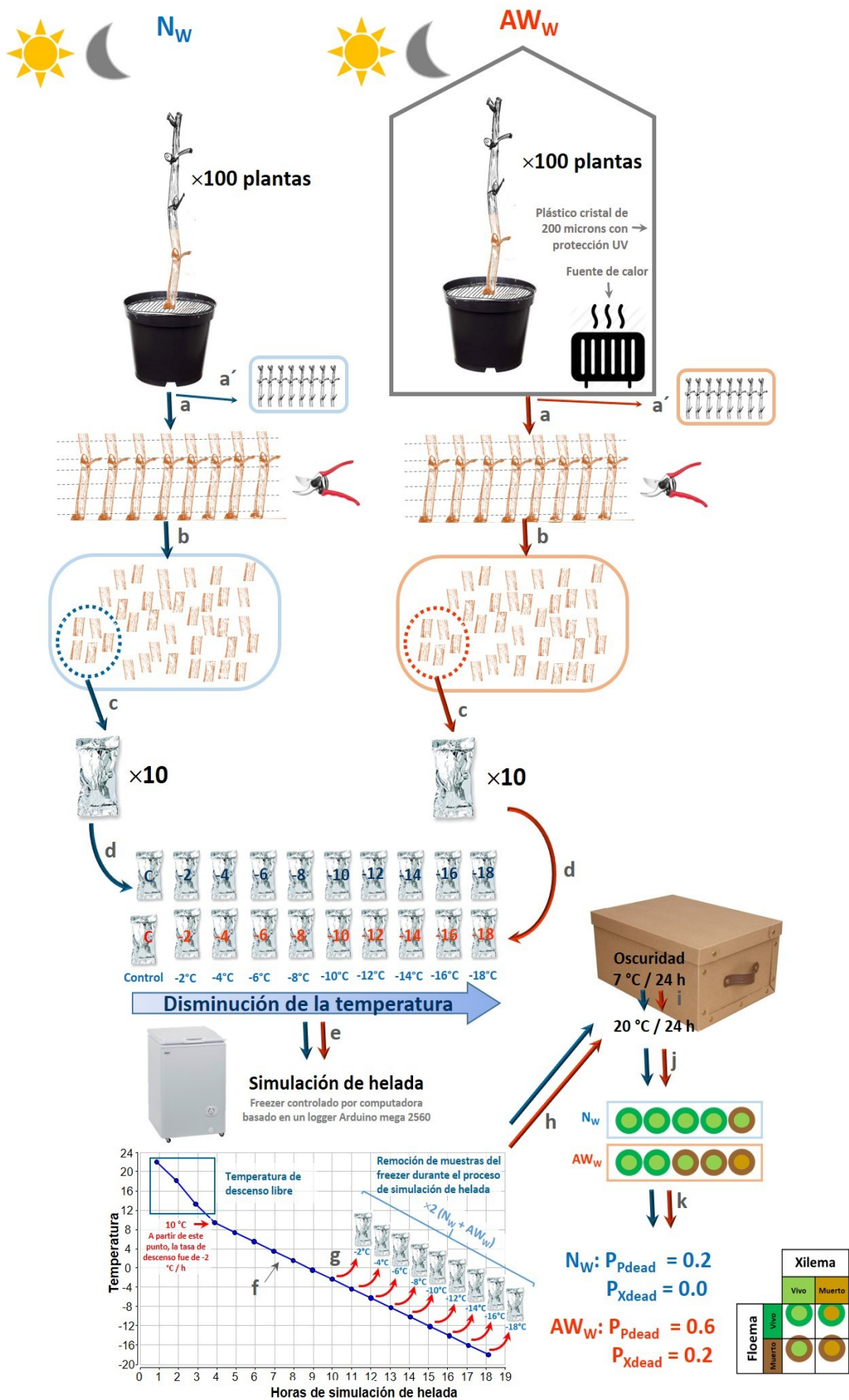


Simulación de helada y determinación del estado de RF

Para las simulaciones de heladas se utilizó el freezer comercial marca Gafa mod Eternity S120 controlado por un equipo controlador basado en Arduino mega 2560. Se estableció una tasa de descenso de $-4\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ a partir del $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, siguiendo los parámetros de la bibliografía internacional. Se monitoreó la temperatura en tiempo real con un sensor integrado DS18B20 observado en una pantalla del controlador.

Las secciones 3 de las plantas seleccionadas para cada fecha de muestreo se procesaron como se indica en la figura 3.2. Cada sección se cortó en sub-partes de 2 cm y se mezclaron al azar. Con ello se hicieron 10 paquetes de papel aluminio con 5 sub-partes de tronco cada uno por tratamiento para ser retirados del freezer cada 2 grados de descenso a partir de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de ser retiradas las muestras se dispusieron en oscuridad a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, y luego de este tiempo se dejaron a temperatura ambiente (alrededor de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por otras 24 hs más. La muerte del tejido se midió por amarronamiento tanto del tejido floemático como el xilemático bajo lupa y se registró el tejido como vivo/muerto (método binomial).

Figura 3.2. Esquema de metodología de muestreo. Se establecieron dos tratamientos térmicos, N_w (en condiciones naturales de campo) y AW_w (en un invernadero con una fuente externa de calor). Los experimentos se realizaron durante la temporada de invierno en los años 2012(A-1), 2013 (A-2) y 2016 (A-3). En total, se emplearon 200 plantas de *Vitis vinifera*, 100 por tratamiento. Cada 15 días, se tomaron muestras de 8 plantas por tratamiento, siendo la porción basal del tronco empleada para la determinación de RF (a), mientras que la porción superior y media para las determinaciones bioquímicas (a *). Dentro de cada tratamiento, las porciones basales de los 8 troncos se fraccionaron en 4-5 sub-secciones de entre 2 y 3 cm cada una. Todas las sub-secciones se mezclaron por tratamiento para obtener una muestra compuesta (b). Cinco sub-secciones fueron seleccionadas al azar de la muestra compuesta y se envolvieron con papel de aluminio (c). En total, se hicieron diez paquetes por tratamiento. En ambos tratamientos, cada paquete se asignó a una temperatura de congelación de -2 a -18 °C cada 2 °C (d). Luego, los paquetes de ambos tratamientos se depositaron dentro de un congelador comercial controlado por una computadora basada en el equipo maderero Arduino mega 2560 (e). Se estableció una temperatura de descenso libre desde la temperatura ambiente hasta alcanzar 10 °C. A partir de este punto, se estableció un índice de caída de -2 °C/h hasta alcanzar -19 °C (f). Durante este proceso, la temperatura fue monitoreada y registrada en tiempo real con un sensor integrado DS18B20. Cuando se alcanzaron las temperaturas asignadas a cada paquete, se retiraron del congelador (f) y se mantuvieron en la oscuridad en una caja a 7 °C durante 24 h (g). Luego, se mantuvieron a 20 °C durante 24 h (j) y se analizaron inmediatamente con lupa estereoscópica para determinar si los tejidos de floema y xilema están vivos o muertos mediante el método de amarronamiento de los tejidos (j). Por lo tanto, se estimó una proporción de tejido vivo a partir de cada temperatura y tratamiento con las sub-secciones de cada paquete (k). Este procedimiento (a-k) se repitió en cada muestra.



Análisis de Almidón y Azúcares solubles totales.

Las secciones 2 se molieron a una granulometría inferior a 0.08 mm. Los análisis de Almidón y AzST se realizaron siguiendo el protocolo de McCready et al. (1951). Se realizó la extracción de los AzST con alcohol 80 %, y se utilizó el pellet resultante para la medición de Alm por espectrofotometría. Los AzST se analizaron por el método de la antrona publicado por Yemm y Willis (1954).

Análisis de aminoácidos libres.

Para este análisis se utilizaron las secciones 1 de tronco que se encontraban congeladas. Se molieron con mortero con la incorporación de nitrógeno líquido para evitar el descongelado de las muestras. Se siguió el protocolo publicado por Yemm et al. (1955) y se midió el contenido de AmLT por espectrofotometría.

Análisis de contenido de agua

La secciones 2 en fresco se pesaron en balanza de precisión marca radwag 220/r2 con una precisión de 0.001 g. Luego se llevaron las secciones a estufa de secado a 60 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se volvieron a pesar y se calculó la diferencia como el CA expresado en porcentaje.

Análisis estadístico

Para la comparación de los diferentes parámetros térmicos entre años y tratamientos, los valores medios de Tmedia, Tmin, Tmax y AT se calcularon utilizando registros diarios durante la temporada de invierno de los años A-1, A-2 y A-3 (n = 90 días por año). Para el análisis de las diferencias entre los parámetros térmicos, se utilizó ANOVA. Cuando los efectos fueron significativos, se realizaron comparaciones múltiples usando el método DGC con $\alpha = 0.05$.

Para el análisis de TL₅₀ en floema y xilema (TL_{50-F} y TL_{50-X}, respectivamente), cada uno de estos tejidos de tronco se registró como "vivo" o "muerto" (familia binomial). Luego, se calculó la proporción de tejidos muertos (PFM y PXM para el floema y el xilema, respectivamente) para cada dosis de frío y tratamiento (n = 5; Figura 3.2 J-K). Luego, las curvas ajustadas de la proporción de daños se obtuvieron usando una regresión logística por modelo lineal mixto generalizado (GLMM, covariable: dosis de frío, efectos fijos: tratamiento y temperatura) en cada año. La comparación estadística se realizó entre curvas, considerando estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$. Entonces, el TL_{50-F} y el TL_{50-X} se obtuvieron mediante la ecuación $\pi = (\exp(\eta)) / (1 + \exp(\eta))$, donde η es la tasa de tejido muerto.

La relación entre el historial térmico y TL_{50-F} y TL_{50-X} se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson. Para esto, se usaron los valores medios de Tmax, Tmin, Tmedia y AT considerando los registros de 1, 3, 5, 10 y 15 días antes de la helada simulada. Del mismo modo, también se realizó una correlación de Pearson entre la RF y el CA. En este caso, los datos se dividieron en dos partes, una de las cuales incluye solo los datos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en RF, y la

otra solo incluyó aquellos datos sin diferencias entre los tratamientos en RF. En ambos casos, se consideraron correlaciones estadísticamente significativas para aquellos con $p < 0.05$. Para los parámetros bioquímicos, las curvas de evolución de AzST, Alm y AmLT en los tratamientos N_w y AW_w se realizaron utilizando los valores medios de muestreo y la desviación estándar ($n = 8$). Para comparar el efecto del tratamiento sobre estas curvas, se utilizó el modelo lineal generalizado (GLM, covariable: tiempo, efectos fijos: tratamiento, muestreo e interacción). Este modelo estima diferencias estadísticas entre curvas ($p < 0.05$) y el ajuste del modelo lo representa por la variable R^2 . El análisis fue dividido para cada año.

Con el fin de integrar las variables térmicas (Tmax, Tmin), fisiológicas y bioquímicas (CA, AzST, AmLT, Almidón) obtenidas en 3 años de mediciones y potencialmente relacionadas con la RF de *V. vinifera* var. Mb (TL_{50-F} y TL_{50-X}), se realizó un análisis multivariado de componentes principales. Además, se realizó una prueba MANOVA, utilizando los mismos criterios de partición descritos anteriormente. Cuando fue significativa, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Hotelling, y se consideró estadísticamente significativa a $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con Infostat v 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

3.3. Resultados

Características térmicas de tratamientos N_w y AW_w

Se generaron dos ambientes contrastantes entre los tratamientos N_w y AW_w durante la temporada de invierno de los tres años analizados. Las diferencias fueron significativas

en prácticamente todas las variables y años analizados (Tabla 3.1). Así se encontró que la T_{media} se mantuvo en el rango de entre 3,3 a 5,1 °C, la T_{max} entre 13,0 y 13,4 °C, la T_{min} entre 0,6 y 2,6 °C y para la AT el rango encontrado fue de entre 10,5 y 12,7 °C, entre tratamientos para los 3 años analizados. Las diferencias interanuales dentro del tratamiento N_w también fueron observadas, pero principalmente en la T_{min} . Además el A-2 fue el más frío, el A-3 es más cálido y el A-1 tuvo un comportamiento intermedio (Fig3.2, Tabla 3.1, FiguSup3)

Tabla 3.1. Comparación de parámetros térmicos durante la temporada de invierno entre dos ambientes térmicos contrastantes: testigo (N_w) vs. ambiente cálido (AW_w). Los valores medios de T_{media} (A), T_{min} (B), $T_{máx}$ (C) y AT (D) se calcularon utilizando registros diarios durante la temporada invernal de los años A-1, A-2 y A-3. *ns* indica diferencias no significativas. Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias estadísticas entre los años ($p < 0,001$).

A)		T_{media} (°C)		
Año	Trat	N_w	AW_w	p
A-1		$9,1 \pm 0,4^b$	$12,4 \pm 0,4^b$	<0,0001
A-2		$7,4 \pm 0,4^c$	$11,9 \pm 0,4^b$	<0,0001
A-3		$11,2 \pm 0,4^a$	$16,3 \pm 0,4^a$	<0,0001

B)		T_{min} (°C)		
Año	Trat	N_w	AW_w	p
A-1		$1,8 \pm 0,3^b$	$2,4 \pm 0,3^b$	<i>ns</i>
A-2		$0,3 \pm 0,3^c$	$2,2 \pm 0,3^b$	<0,0001
A-3		$6,1 \pm 0,3^a$	$8,7 \pm 0,3^a$	<0,0001

C)		T_{max} (°C)		
Año	Trat	N_w	AW_w	p
A-1		$20,0 \pm 0,6^a$	$33,4 \pm 0,8^a$	<0,0001
A-2		$17,0 \pm 0,6^b$	$30,0 \pm 0,8^b$	<0,0001
A-3		$16,7 \pm 0,6^b$	$31,0 \pm 0,8^b$	<0,0001

D)		TA (°C)		
Año	Trat	N_w	AW_w	p
A-1		$18,3 \pm 0,5^a$	$31,0 \pm 0,8^a$	<0,0001
A-2		$17,4 \pm 0,5^a$	$27,9 \pm 0,8^b$	<0,0001
A-3		$10,5 \pm 0,5^b$	$22,3 \pm 0,8^c$	<0,0001

También se observaron diferencias interanuales entre los inviernos, principalmente en la variación de T_{min} . Por lo tanto, mientras que A-2 fue el año más frío (rango promedio diario de -0,6 a 0,0 °C), el A-3 fue el más cálido (rango promedio diario de 5,8 a 6,4 °C) (Figura 3.3, Tabla 3.1). En cuanto a la respuesta de T_{min} en el tratamiento AW_w , también

hubo una variación interanual, donde en el A-1 no hubo diferencias con el testigo N_w ($T_{min_{AWW}} - T_{min_{Nw}} = 0,6 \text{ } ^\circ \text{C}$), contrariamente a lo observado en A-2 y A-3 ($T_{min_{AWW}} - T_{min_{Nw}} = 2,5$ y $2,6 \text{ } ^\circ \text{C}$ respectivamente; Figura 3.3, Tabla 3.1).

Figura 3.3. Comparación de los días promedio de los diferentes ambientes evaluados. N_w graficado en azul y AW_w graficado en rojo. Tmax y Tmin fueron registradas cada hora durante la temporada de invierno (90 días) en A-1 (A), A-2 (B) y A-3 (C). El espesor de la línea denota la variabilidad de las temperaturas entre los días de invierno. Las líneas punteadas indican el Tmax y Tmin promedio del tratamiento de testigo N_w .

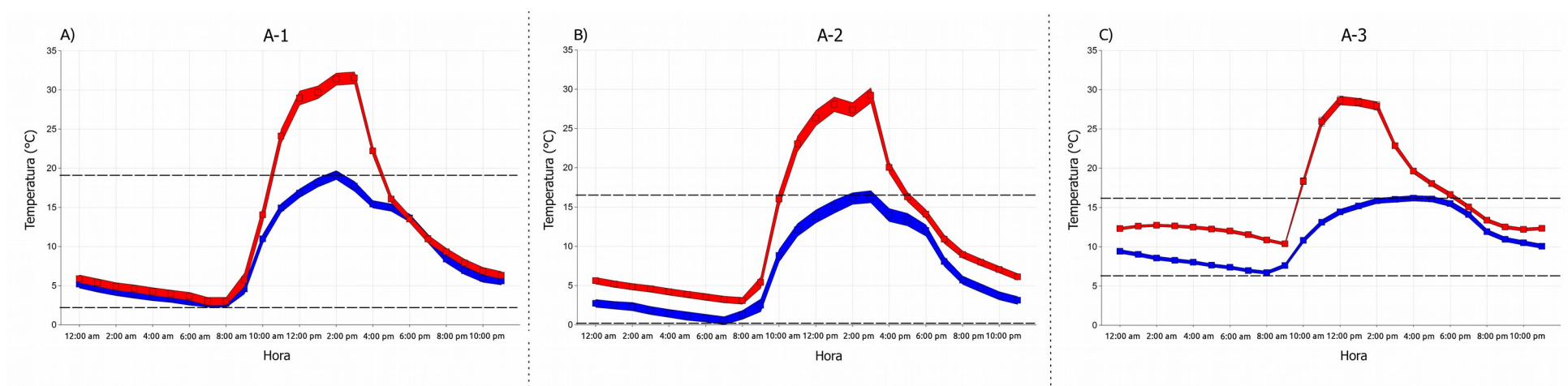
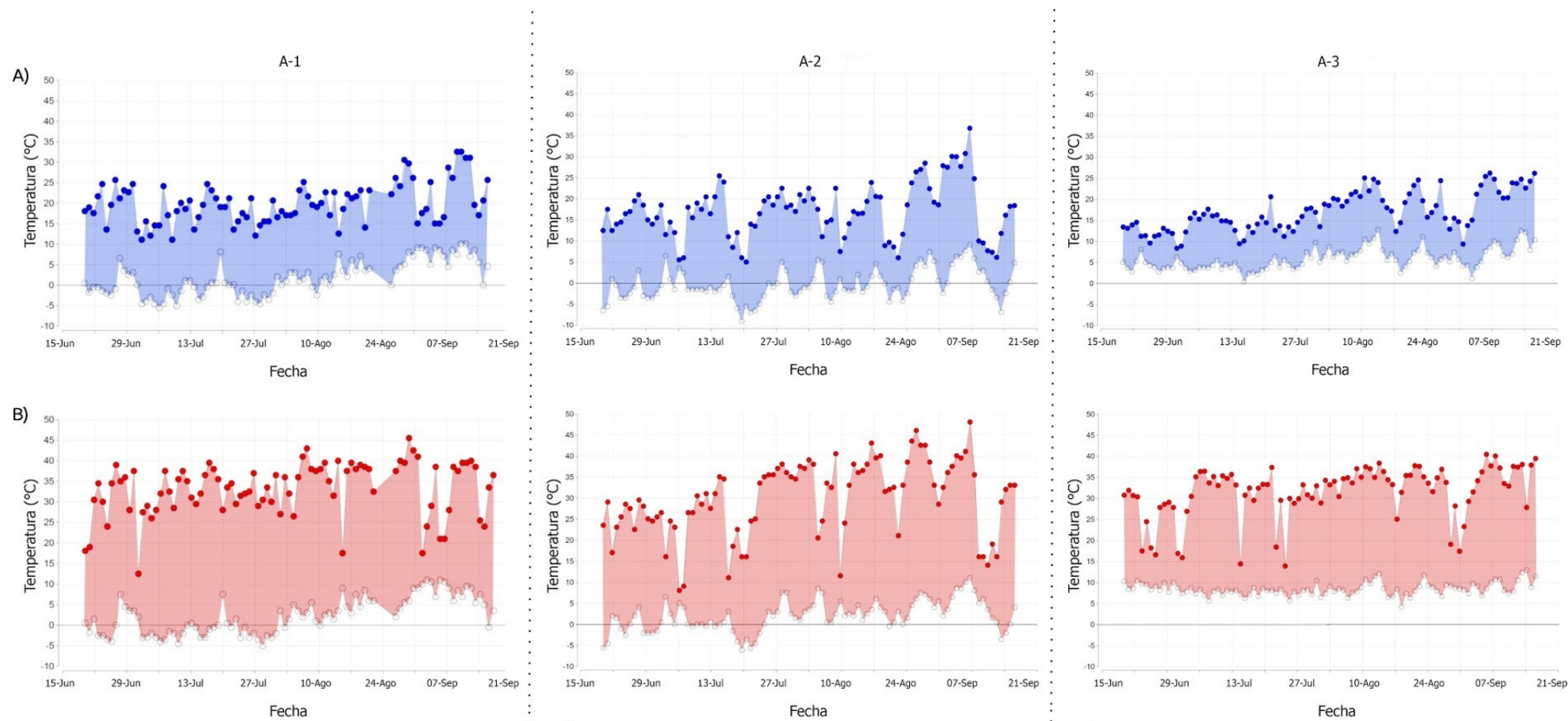
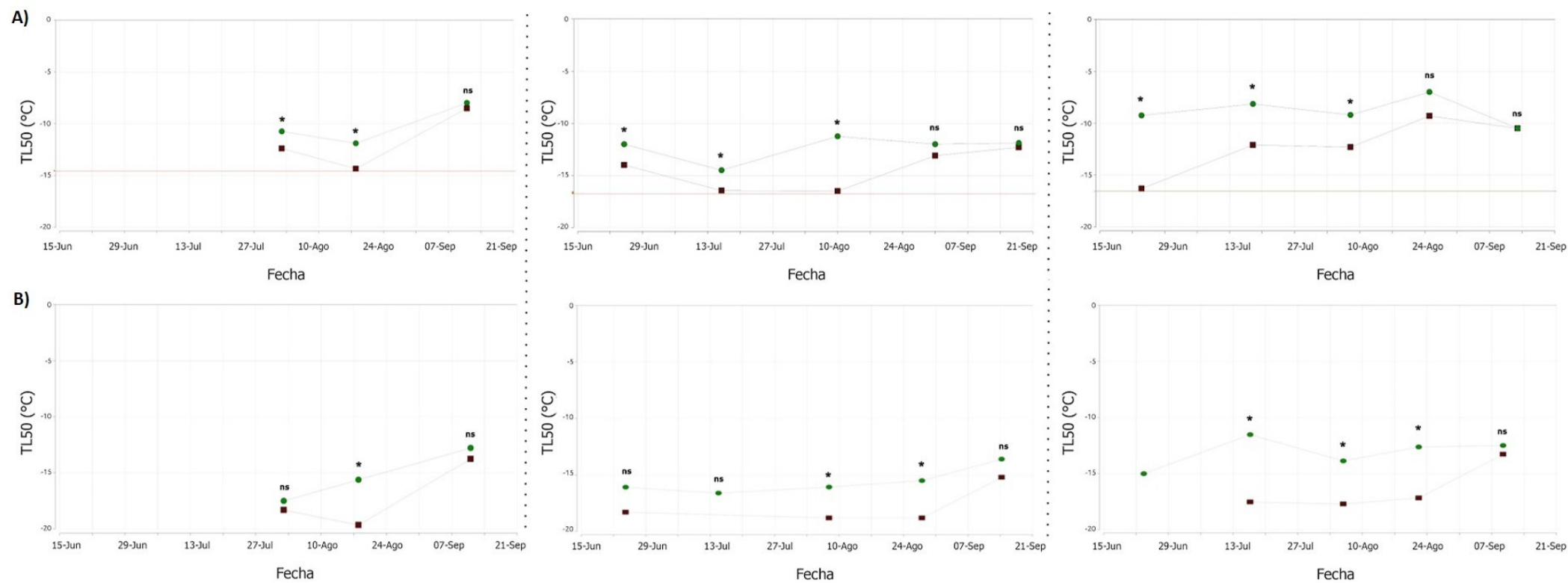


Figura 3.4. Comparación de tres años diferentes de temperaturas de invierno y su impacto en la resistencia al frío en *Vitis vinifera* var. Malbec: Tmax y Tmin se registró diariamente bajo Testigo (N_w ; A) y condiciones modificadas artificialmente (AW_w ; B). La resistencia al frío se evaluó cada 15 días en los tejidos del tronco tanto para floema (C) como xilema (D). El análisis se realizó en los tres años de mediciones durante la temporada de invierno ($n = 3$ años, 2012, 2013 y 2016, A-1, A-2 y A-3 respectivamente). * Indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) y ns indican diferencias no significativas. En C) la línea roja indica la temperatura de RF máxima para ese año en el tratamiento N_w



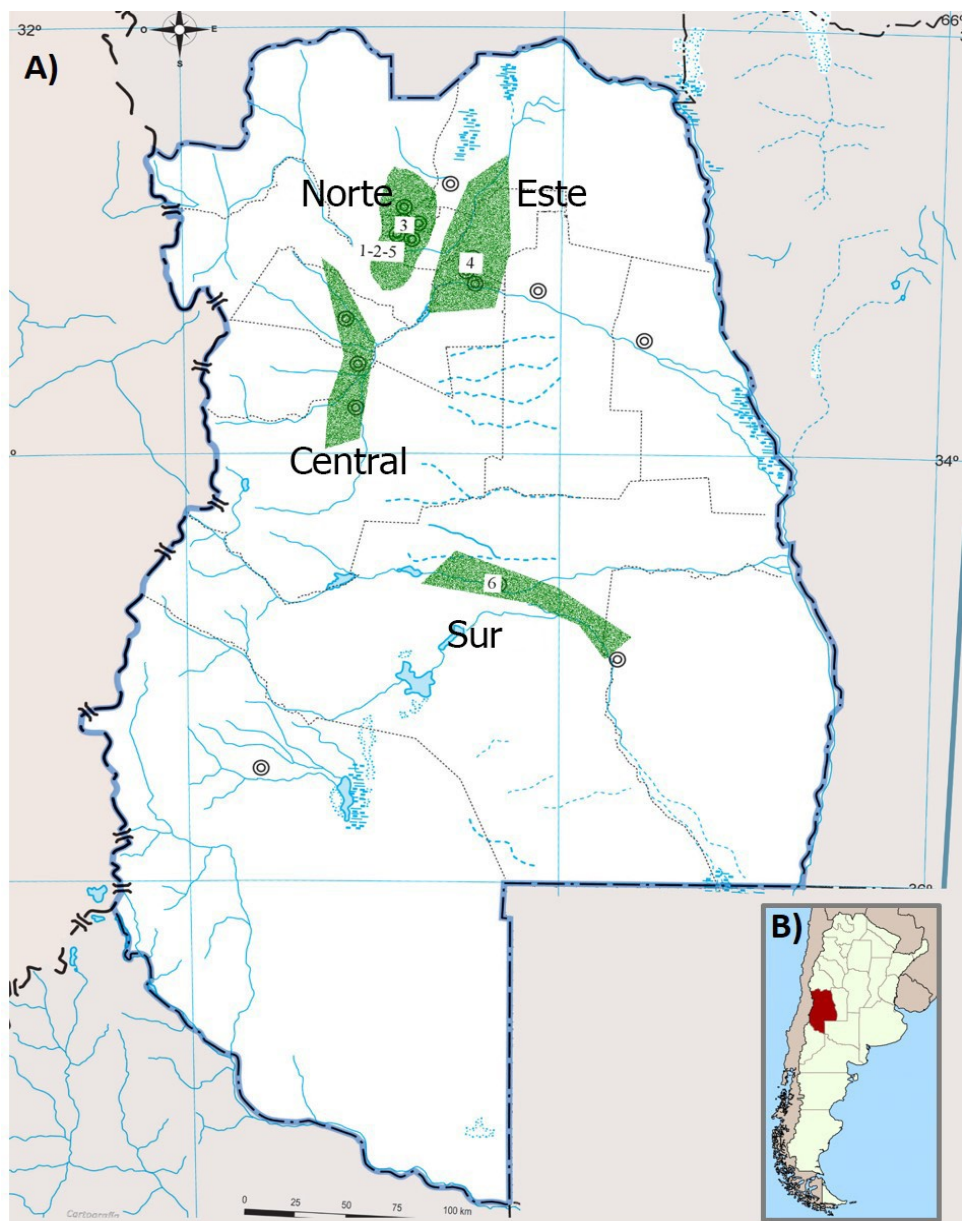


Índices ecológicos

Se observaron diferencias en el índice ΣT_{min} al comparar ambos entornos térmicos, N_w y AW_w . En todos los años, el entorno térmico modificado (AW_w) exhibió valores más altos para este índice (Figura 3.5C). Estas diferencias se mantuvieron en los años A-1, A-2 y A-3, pero con diferente magnitud del incremento en AW_w : 20, 130 y 33%, respectivamente. Para A-1 y A-2 (ambos años se realizaron en el departamento de Luján de Cuyo) los valores de ΣT_{min} en el tratamiento N_w presentaron valores interanuales muy diferentes entre ellos (ΣT_{min} : 422,4 y 213,7 para A-1 y A-2 respectivamente). Por el contrario, los entornos de AW_w registraron valores de índice muy similares (ΣT_{min} : 516,2 y 499,1 en A-1 y A-2, respectivamente). En el caso de A-3, realizado en un lugar más cálido de MZA (en Godoy Cruz), los valores de ΣT_{min} resultaron más altos ($N_w = 912,3$ y $AW_w = 1214,0$).

Con respecto al índice $n^\circ D < -3$, no se observaron diferencias entre los tratamientos para un mismo año durante A-1 y A-3. Sin embargo, la variación interanual fue muy marcada entre estos los años ($n^\circ D < -3 = 15$ y 0 respectivamente). A-2 fue el más contrastante, así para el caso de este índice, el entorno N_w registró un valor 2.6 veces mayor con respecto a AW_w (24 días en N_w versus 9 días en AW_w ; Figura 3.5C).

Figura 3.5. A) Esquema con la demarcación de los 4 oasis productivos de la provincia de Mendoza (Norte, Este, Centro, Sur; marcados en verde) B) Ubicación geográfica de la provincia de Mendoza en el territorio de la República Argentina. C) Coordenadas geográficas e índices ecológicos para los tratamientos térmicos a los cuales se sometieron plantas *Vitis vinifera* cv Malbec durante 3 años, 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente) y su comparación con 3 oasis productivos de la provincia Oasis Este (San Martín), Oasis Norte (Luján de Cuyo) y Oasis Sur (San Rafael) evaluados durante el periodo 2001-2010. Los números que aparecen en A) se corresponden con el ID de C).



C) ID	Año	Lugar	Coordenadas	Índice Ecológico	
				Σt_{min}	n.º D <-3
1	A-1	Nw	33° 35' 24" S 68° 30' 0" W	422,4	15
		AWw	33° 35' 24" S 68° 30' 0" W	517,2	15
2	A-2	Nw	33° 35' 24" S 68° 30' 0" W	213,7	24
		AWw	33° 35' 24" S 68° 30' 0" W	499,1	9
3	A-3	Nw	32° 55' 4.8" S 68° 50' 31.2" W	912,3	0
		AWw	32° 55' 4.8" S 68° 50' 31.2" W	1214	0
4	Promedio 01-10'	San Martín	33° 3' 0" S 68° 18' 0" W	766	3
5		Luján de Cuyo	33° 35' 20" S 68° 30' 5" W	467	13
6		San Rafael	34° 21' 0" S 68° 12' 0" W	575	9

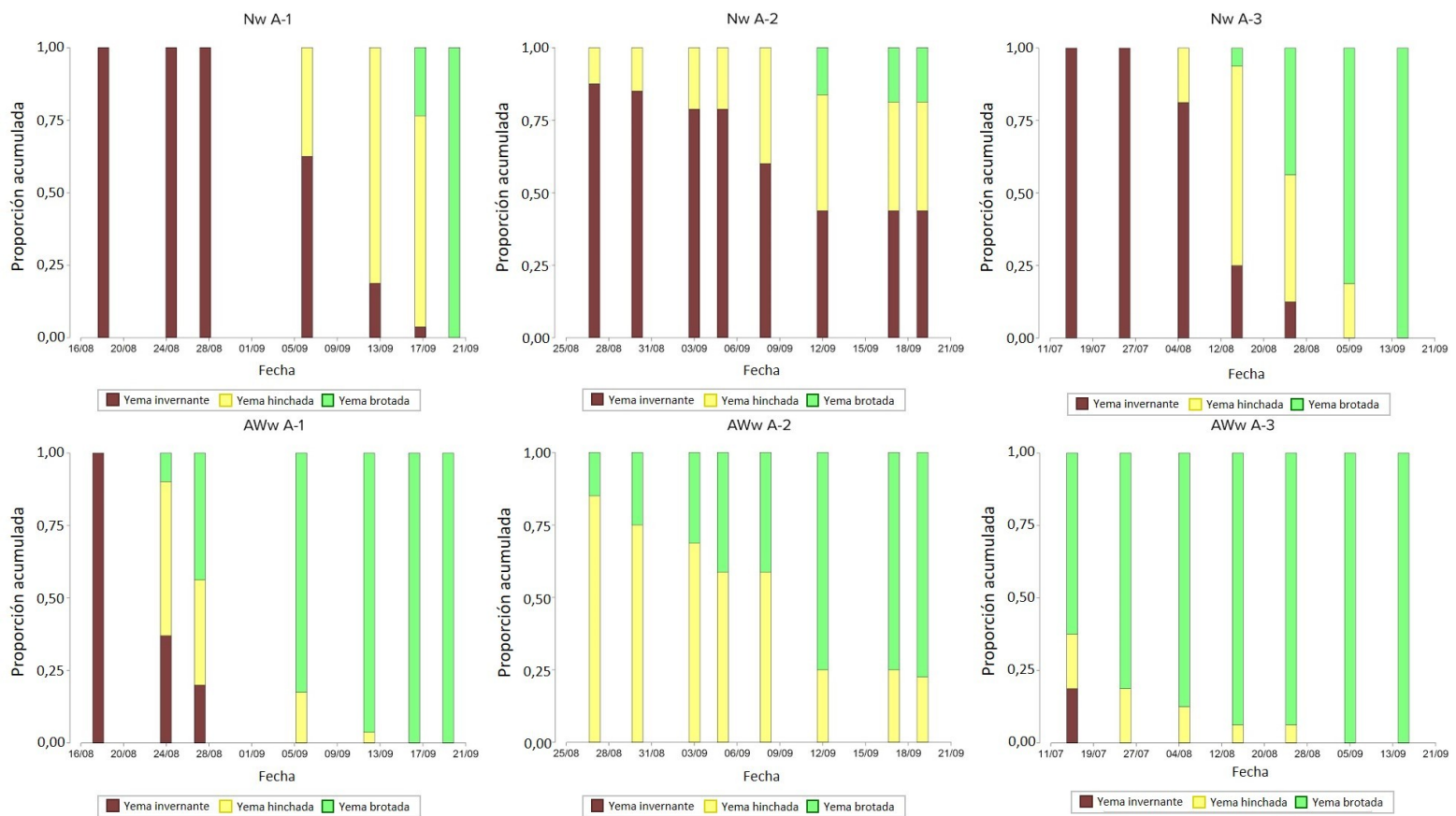
Efecto de los ambientes térmicos sobre la fenología de Vitis vinifera

El comienzo de la brotación se adelantó en más de 15 días en el tratamiento AW_w con respecto al tratamiento N_w , siendo este número de días variable entre los diferentes años (Tabla 3.2, Figura 3.6). En este sentido, mientras que en el A-1 y A-2 las fechas de inicio de brotación fueron muy similares, en el A-3 se adelantó aproximadamente un mes dentro de cada tratamiento. Por otra parte, en el año más frío analizado (A-2) la diferencia de días para la brotación entre AW_w y N_w fue la más pequeña.

Tabla 3.2. Fecha de comienzo de la brotación de plantas (Estado 7 en escala EL modificada) de *Vitis vinifera* var. Malbec sometidas a diferentes ambientes térmicos (N_w = Testigo, Invierno normal; AW_w = ambiente calefaccionado artificialmente) durante 3 años de medición 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente).

Año	Comienzo de la brotación		
	N_w	AW_w	Dif en días
A-1	17-Sept	24-Aug	24
A-2	12-Sept	26-Aug	17
A-3	12-Aug	11-Jul	32

Figura 3.6. Etapas fenológicas de *Vitis vinifera* var. Malbec sometidas a dos ambientes térmicos contrastantes (N_w y AW_w) durante la temporada de invierno de los años 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente). Barras marrones representan el estado de yema invernante, barras amarillas el estado de yema hinchada y barras verdes el estado de yema brotada.



Resistencia al frío invernal de los tejidos del floema y xilema del tronco de vides sometidas a diferentes ambientes térmicos.

Se observó un patrón repetido en los 3 años medidos sobre la evolución del estado de RF en el floema, medido como TL_{50} , a lo largo de la estación invernal, con diferencias significativas entre fechas y tratamientos (Figura 3.4, 3.7). Así, durante el invierno temprano e intermedio se observaron diferencias significativas en la RF del floema entre N_w (rango de TL_{50-F} : -12,1 a -16,5 °C) y AW_w (rango de TL_{50-F} : -8,2 a -14,5 °C), siempre siendo las plantas de N_w las que presentaron mayores RF (Tabla 3.3A). Esta diferencia

desapareció hacia el final del invierno y el comienzo de la primavera. Además, las condiciones climáticas de cada año también afectaron el nivel de RF en el floema. Por lo tanto, A-2 (el año más frío) mostró los mayores valores de RF (es decir, resistencia a temperatura más bajas), mientras que A-3 (el año más cálido) describió una tendencia opuesta (Tabla 3.3A).

Tabla 3.3. TL₅₀ en floema (A) y xilema (B) de troncos de *Vitis vinifera* var. Malbec durante la temporada de invierno en dos ambientes térmicos contrastantes (N_w y AW_w) de tres años de medición, 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente). En la columna **p** se indica el efecto del tratamiento.

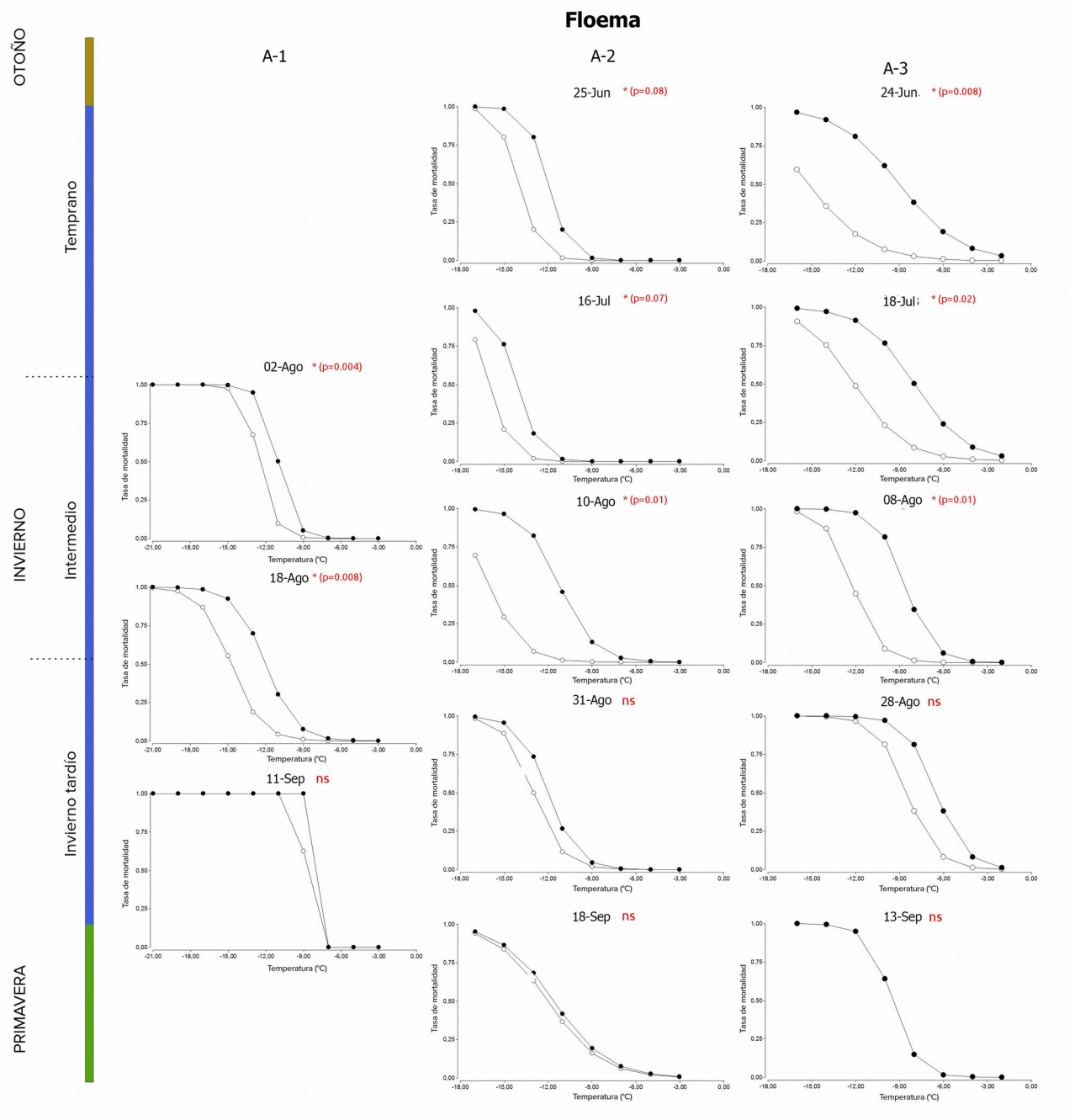
nd: sin dato; ns: no significativo; *: Diferencias significativas; **p**: Indica si existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos o no durante los diferentes momento de muestreo. Obtenido durante diferentes etapas de invierno extraídas de la Figura 3.7 y Figura 3.8. Los valores en negrita y subrayados indican el momento de brotación para el tratamiento. Dif = indica la diferencia de RF entre tratamientos

A					
TL₅₀ de Floema (°C)					
Año	Fecha	p	N_w	AW_w	Dif
1	2 de agosto	*	-12.4	<u>-10.8</u>	1.6
	18 de agosto	*	<u>-14.4</u>	-11.9	2.5
	11 de septiembre	ns	-8.5	-8.0	0.5
2	25 de junio	*	-14.0	-12.0	2.0
	16 de julio	*	-16.4	-14.5	1.9
	10 de agosto	*	-16.5	<u>-11.2</u>	5.2
	31 de agosto	ns	<u>-13.1</u>	-12.0	1.1
	18 de septiembre	ns	-12.3	-11.9	0.4
3	24 de junio	*	-16.3	-9.2	7.0
	18 de julio	*	-12.1	<u>-8.2</u>	3.9
	8 de agosto	*	<u>-12.3</u>	-9.2	3.1
	28 de agosto	ns	-9.3	-7.0	2.3
	13 de septiembre	ns	-10.5	-10.5	0.0

B

TL ₅₀ de Xilema (°C)					
Año	Fecha	p	N _w	AW _w	Dif
1	2 de agosto	ns	-18.8	-17.5	1.3
	18 de agosto	*	-19.6	-15.6	4.0
	11 de septiembre	ns	-13.8	-12.8	1.0
2	25 de junio	ns	-18.3	-16.1	2.2
	16 de julio	nd	<-19.0	-16.6	< 2.4
	10 de agosto	*	-18.8	-16.1	2.7
	31 de agosto	*	-18.8	-15.5	3.3
	18 de septiembre	ns	-15.2	-13.6	1.6
3	24 de junio	nd	<-19.0	-15.0	< 4.0
	18 de julio	*	-17.5	-11.5	6.0
	8 de agosto	*	-17.7	-13.9	3.8
	28 de agosto	*	-17.2	-12.6	4.5
	13 de septiembre	ns	-13.3	-12.5	0.8

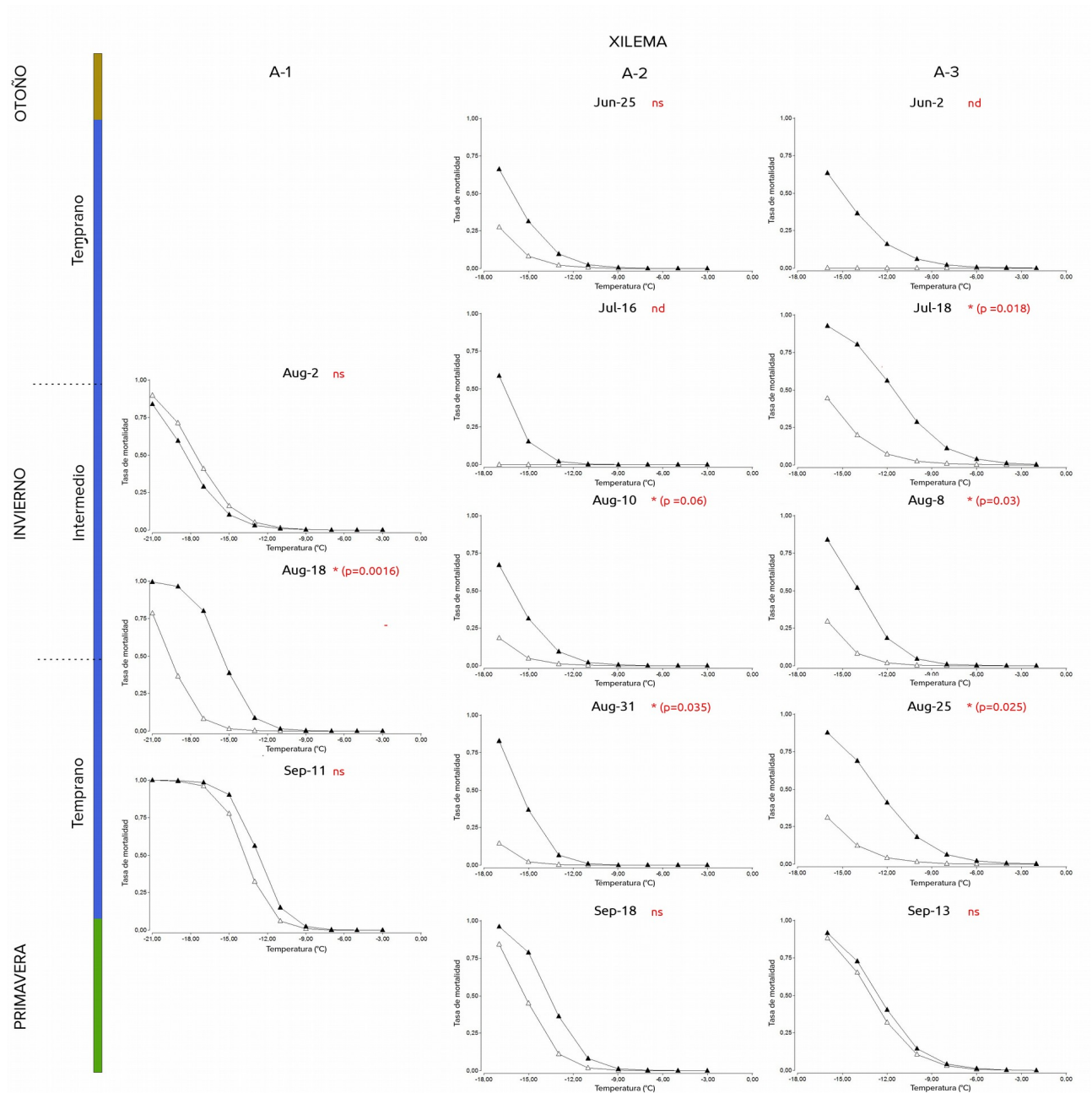
Figura 3.7. Evolución de la resistencia al frío del floema durante la temporada de invierno en campo (N_w) y en condiciones artificiales (AW_w). El estado de resistencia al frío del tejido floemático del tronco de *Vitis vinifera* var. Malbec se midió cada 15 días mediante el método de amarronamiento después de una simulación de helada durante la temporada invernal de los años 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente). * indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) y *ns* indican diferencias no significativas.



Los resultados de TL_{50} en el xilema fueron menos claros que los observados para el floema (Figura 3.8, Tabla 3.3B), sin embargo el xilema mostró una resistencia al frío mayor que el floema (rango de xilema TL_{50} : -17,2 a <-19,0 ° C). La temperatura ambiente en cualquiera de los oasis productivos de MZA no alcanza las temperaturas de resistencia para el xilema, es decir, que este tejido a escaparía a la posibilidad de daño en las condiciones normales de MZA.

Por otra parte, el efecto del tratamiento más cálido sobre la desaclimatación al frío se extiende hacia la primavera temprana (Tabla 3.3B).

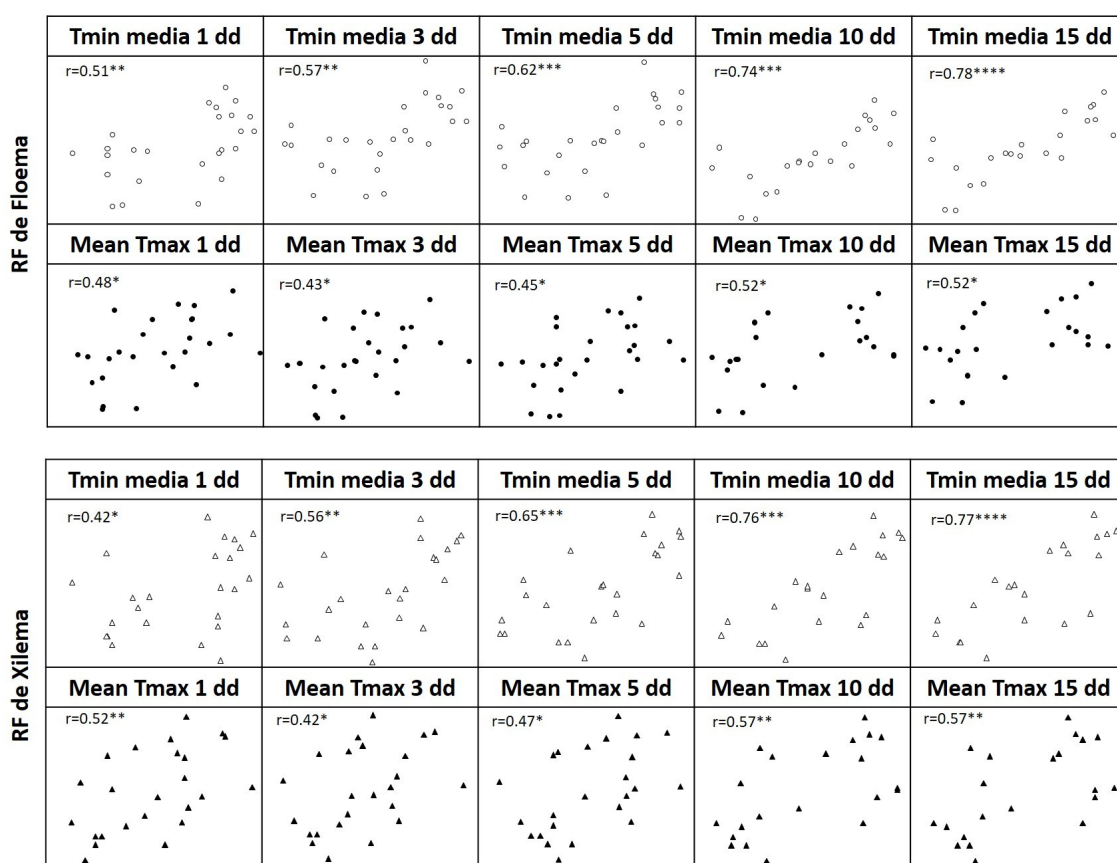
Figura 3.8. Evolución de la resistencia al frío del xilema durante la temporada de invierno en campo (N_w) y en condiciones artificiales (AW_w). El estado de resistencia al frío del tejido xilemático del tronco de *Vitis vinifera* var. Malbec se midió cada 15 días mediante el método de amarronamiento después de una simulación de congelación durante la temporada invernal de los años 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente). * indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) y ns indican diferencias no significativas.



Con el fin de explorar qué variables térmicas están más relacionadas con el estado de RF de las plantas de vid, se realizaron diferentes correlaciones entre el TL₅₀ del floema (TL_{50-F}) y del xilema (TL_{50-X}) frente a las variables térmicas promedio de los días previos a la evaluación de la RF (Figura 3.9). Estas correlaciones fueron significativas

considerando los valores medios de Tmax y Tmin del día anterior a la medición de RF en floema y xilema. Sin embargo, la correlación mejora a medida que se consideran más días en el análisis en ambos tejidos, siendo mayor cuando se consideran los 15 días previos. Tmin fue la variable que mejor se ajustó al análisis de correlación, explicando mejor el estado de resistencia al frío que la Tmax. También se probaron otras variables térmicas, tales como TA y Tmedia, sin embargo, no presentaron una mejor correlación con la RF a través de la historia térmica de las plantas (datos no mostrados).

Figura 3.9. Influencia del ambiente térmico sobre la resistencia al frío de los tejidos del floema y xilema del tronco de la vid. Análisis de correlación de la media de Tmax (°C) y Tmin (°C) registrada a los 1, 3, 5, 10 y 15 días antes de la medición del estado de resistencia al frío en los tejidos del floema y xilema. El análisis se realizó con todas las mediciones de RF obtenidas durante las temporadas de invierno de 3 años (n = 23). El número de asteriscos indica el nivel de significación del análisis de correlación, siendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,0001$ y **** = $p < 0,00001$.



Mediciones fisiológicas en ambientes con diferente historia térmica

Las plantas sometidas al calentamiento artificial (AW_w) tienden a acumular más CA (%) que las plantas en condiciones naturales (N_w) en los 3 años analizados. Por otra parte, durante la etapa donde la RF entre tratamientos fue significativa se observó una alta correlación entre CA y RF medida como TL_{50-F} y XTL_{50-X} de tejidos de troncos (Tabla 3.4). Sin embargo, esta diferencia desapareció en la etapa del invierno donde el efecto del tratamiento sobre la RF fue nulo (no significativa = ns).

Tabla 3.4. Análisis de correlación entre el CA y la RF en troncos de *Vitis vinifera* var. Malbec (medidas como TL₅₀ del floema y TL₅₀ del xilema) entre tratamientos durante tres años de mediciones invernales, 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3, respectivamente). Los datos fueron divididos en dos partes, según el efecto de tratamiento. Así se agruparon los muestreos que registraron diferencias significativas (*) y los que no (*ns*).

	Muestreos	TL50 Floema	TL50 Xilema
CA	*	0.64 p=0.0073	0.83 p=0.0002
	<i>ns</i>	-0.21 <i>ns</i>	0.29 <i>ns</i>

Los AzST también experimentaron una modulación diferencial por tratamiento durante la temporada de invierno. En este caso, a pesar de que las condiciones térmicas de N_w y AW_w fueron muy diferentes en los tres años analizados, el contenido de azúcar de las plantas en condiciones N_w fue siempre mayor que en AW_w (Figura 3.10). Sin embargo, también se observa una tendencia a que los AzST disminuyan mientras más cercano el momento de brotación. Por otra parte, el efecto del tratamiento sobre el contenido de AzST es nulo cuando las plantas pierden la aclimatación en frío (hacia el final del invierno, Figura 3.10).

Figura 3.10. Evolución contenido de AzST en troncos de *Vitis vinifera* var. Malbec sometidas a dos ambientes térmicos diferentes durante de invierno de 3 años, 2012, 2013 y 2016 (A-1, A-2 y A-3 respectivamente): Testigo o N_w (O) vs. ambiente cálido o AW_w (●). Las mediciones se realizaron cada 15 días (n = 8 plantas por tratamiento y fecha). La parte sombreada indica el período de invierno en el efecto del ambiente térmico fue significativo para la RF. La hoja de vid indica el inicio de la brotación. Barras indican dispersión de los datos. R² y p corresponden a las variables respuesta del modelo GLM por el cual se comparan las curvas.

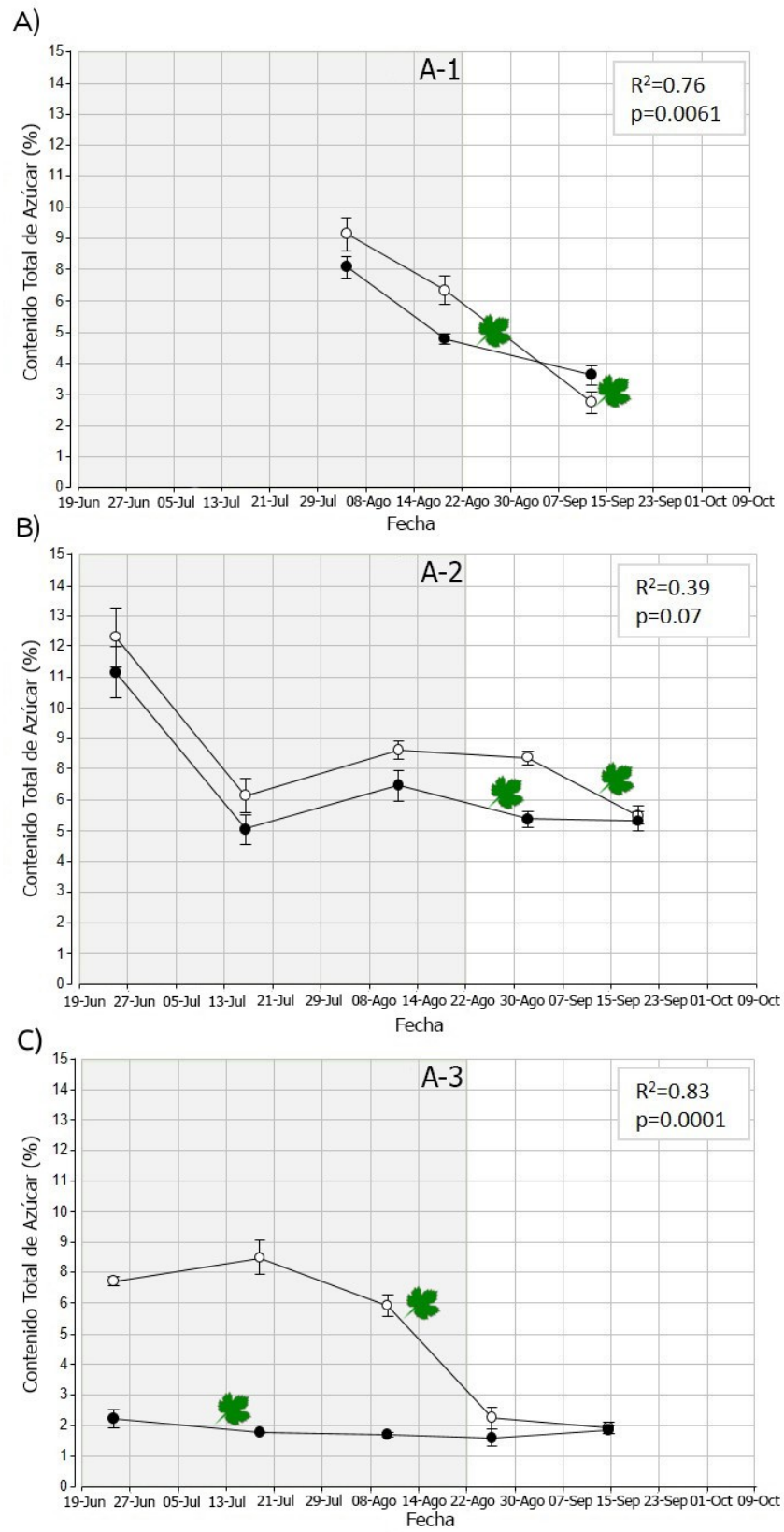
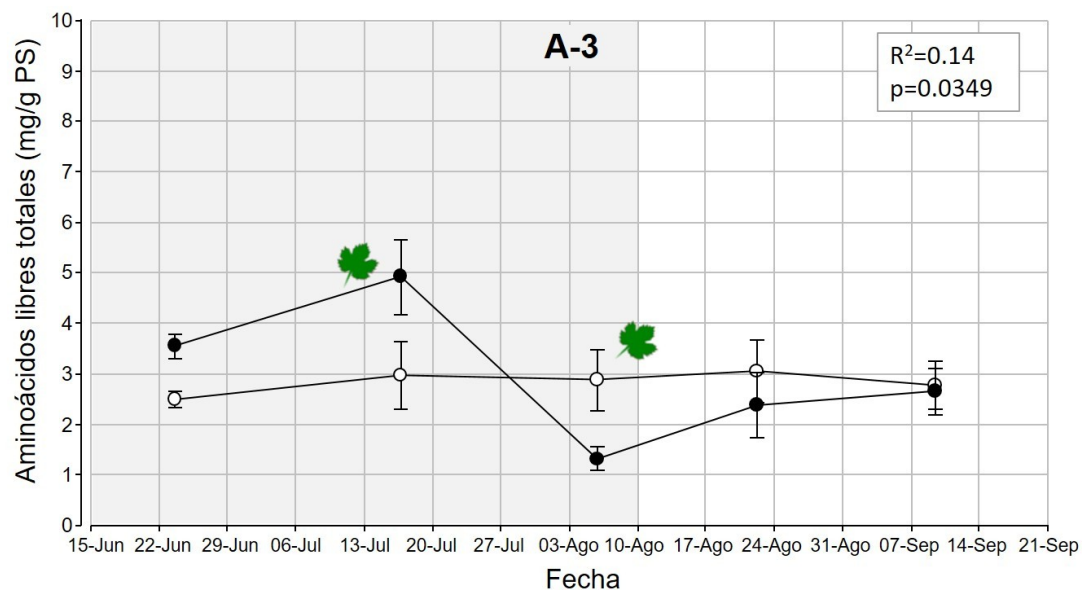


Figura 3.11. Evolución del contenido de AmLT en troncos de *Vitis vinifera* var. Malbec sometidas a dos diferentes ambientes térmicos durante la estación invernal del 2016 (A-3): Testigo o N_w (O) vs. ambiente cálido o AW_w (●). Las mediciones se realizaron cada 15 días ($n = 8$ plantas por tratamiento y fecha). La parte sombreada indica el período de invierno en el que existe un efecto significativo del ambiente sobre la RF. La hoja de vid indica el inicio de la brotación.

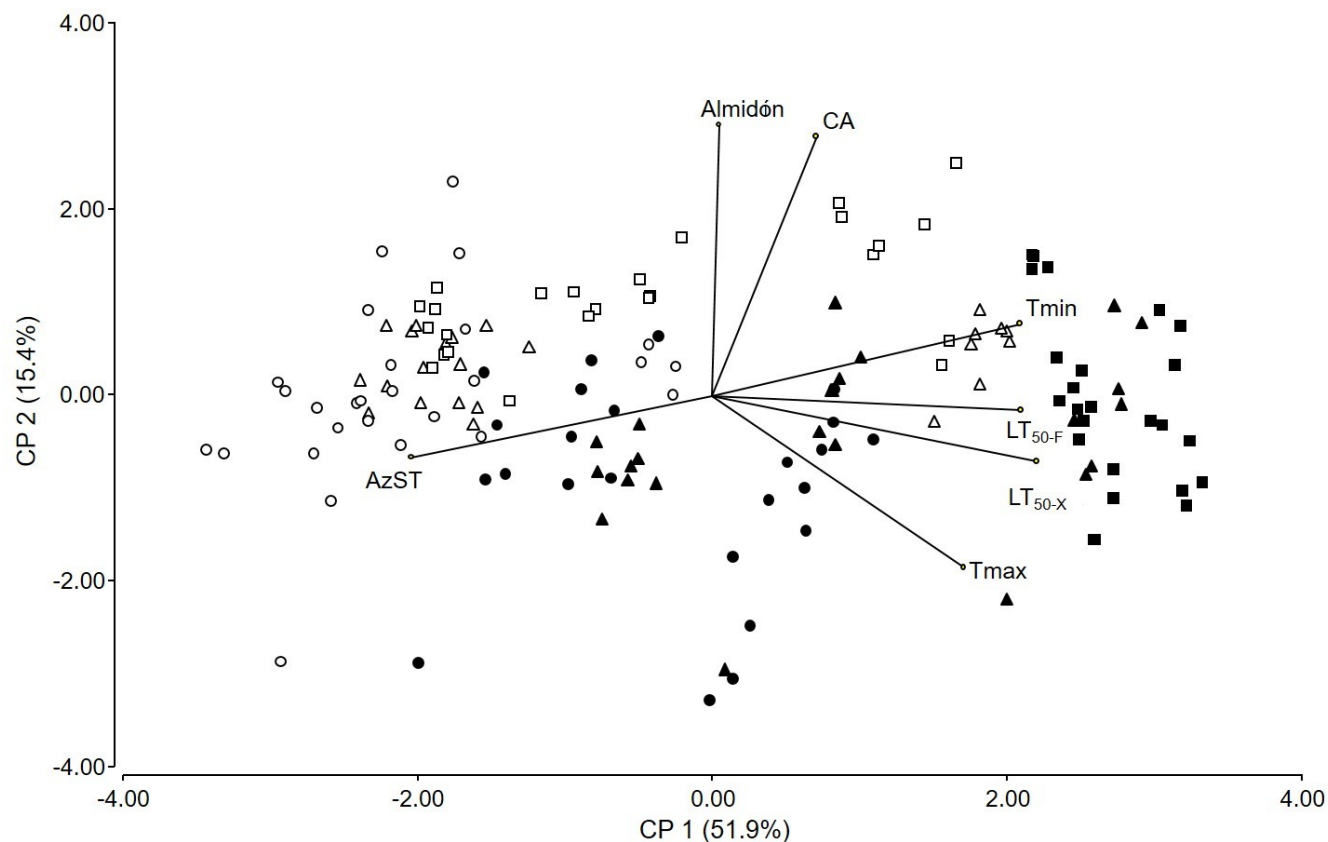


El análisis de AmLT solo se realizó en el último año (A-3). Bajo condiciones de campo, N_w , los contenidos de los mismos no se vieron modificados por las condiciones, permaneciendo prácticamente constantes a lo largo de todo el periodo analizado (Figura 3.11). Contrariamente, en el tratamiento con ambiente térmico modificado (AW_w), se observó una gran variación en el contenido de los mismos, pero no se pudo relacionar con los cambios en los valores de RF. Esto sugiere que, por lo menos en las condiciones evaluadas, los AmLT no estarían relacionados con los procesos de aclimatación al frío.

Con el fin de realizar una comprensión más integral respecto a las variables involucradas en los procesos de aclimatación, desaclimatación de la vid debido a la

historia térmica a las cuales están sometidas, realizamos un análisis de componentes principales de todas las variables evaluadas en este capítulo en los tres años de medición. Se puede observar que las dos primeras componentes canónicas suman el 67,3 % de la variación total. La mayor variación está explicada por el Componente 1 (51,9%), donde se separan claramente las variables canónicas de N_w (cuadrantes izquierdos) y AW_w (cuadrantes derechos). El contenido de AzST está fuertemente relacionado con N_w , mientras que la resistencia al frío en floema (TL_{50-F}) y xilema (TL_{50-X}) y las T_{max} y T_{min} afectan considerablemente las plantas desaclimatadas sometidas al ambiente térmico AW_w . El componente 2 por su parte explica solamente el 15,4% de la variación, aportando variación en este eje las variables Almidón. El CA agua está parcialmente relacionado con el tratamiento AW_w , indicando que a mayor contenido de agua, menor grado de aclimatación. El análisis multivariado de la varianza de todas las variables indica que ambos tratamientos fueron significativamente diferentes (MANOVA, $p < 0.0001$; Comparación de medias por Hotelling test significativo).

Figura 3.12. Análisis de componentes principales de variables térmicas (Tmin y Tmax), fisiológicas (TL_{50-F} y TL_{50-X}) bioquímicas (CA, AzST, Almidón) involucradas en la resistencia al frío en *Vitis vinifera* var. Malbec a lo largo de tres años. Se indica el resultado de análisis multivariado de la varianza para ambos casos y el nivel de significancia de comparación de las medias por Hotelling para los casos donde en MANOVA resultó significativo. Símbolos blancos corresponden a N_w (A-1 Δ; A-2 □; A-3 ○) y los símbolos negros corresponden a AW_w (A-1 ▲; A-2 ■; A-3 ●)



Prueba de Roy MANOVA significativa ($p < 0,0001$). Comparación de medias por prueba de Hotelling.

Tratamiento	CA	AzST	Almidón	TL _{50-F}	TL _{50-X}	Tmin	Tmax	n	
N _w	47.6	6.7	10	-13.1	-17.7	2.2	17.1	76	A
AW _w	47	4.9	9.1	-10.5	-14.8	4.6	31.2	73	B

Medias con letras diferentes poseen diferencias significativas ($p < 0,05$)

3.4. Discusión

Regiones agroecológicas en el contexto del cambio climático

Aunque el macroclima de la provincia MZA se rige por los mismos parámetros meteorológicos (ocurrencia de vientos *Zonda*, lado sotavento de Cordillera de los Andes, índice de continentalidad alto), las condiciones de mesoclima y microclima determinan diferentes condiciones agrometeorológicas en los diferentes oasis productivos de región de estudio. Los datos publicados previamente describen las diferencias meteorológicas y agroecológicas entre los cuatro oasis productivos de la provincia (DACC 2014-2015, González et al. 2009). Sin embargo, también se han registrado diferencias entre zonas dentro del mismo oasis, con diferencias en el promedio anual registrado de T_{media} de hasta 4 °C (DACC 2014-2015)

La estrecha relación entre los parámetros meteorológicos y la biología de los cultivos, como las vides, definen las características agroecológicas de los oasis productivos. Numerosos índices climáticos se usan para estimar el potencial vitivinícola a nivel regional, la mayoría de los cuales utiliza la temperatura (como una sumatoria de grados por sobre un umbral de crecimiento) y cierta estimación de la radiación solar. Uno de ellos es el índice de Huglin (HI; Huglin 1983), que se basa en la insolación y temperatura de una zona para determinar la idoneidad como zona vitícola y que permite distinguir claramente los diferentes oasis productivos de MZA: oasis Este (departamento de San Martín; HI = 2855 °C); Oasis Norte (en el departamento de Luján de Cuyo, HI 2369 °C); Oasis Central (en el departamento de San Carlos, 1495 °C); Oasis Sur (en el departamento de San Rafael, HI 2556 °C) (González et al. 2009, Cavagnaro et al. 2014,

Deis et al. 2015, Figura 3.5C). El tiempo entre brotación y el envero (cambio en el color de la uva del verde al color final) también se puede usar como índice para resaltar las diferencias entre los oasis: 192 días en el oasis Este (departamento San Martín); > 197 días en el oasis Norte (departamento de Luján de Cuyo); > 210 días en el oasis Central (departamento de La Consulta) según DACC (2012). Estos índices (así como otros) están asociados con las características químicas y organolépticas de las uvas para la elaboración del vino y la calidad del vino (González et al. 2009).

Aunque los índices mencionados anteriormente dan cuenta de que las regiones agroclimáticas de MZA son diferentes, solo tienen en cuenta el período de crecimiento de la planta (septiembre a abril para el hemisferio sur). Sin embargo, no se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de índices para el período de la ED. Las importancias de los índices durante la ED es que podrían usarse para medir la sostenibilidad de una variedad bajo las inclemencias del invierno, y también para estimar el momento del inicio de la brotación. Deis et al. (2015) publicaron algunos índices ecológicos para el receso invernal utilizando 10 años de registros térmicos (2001-2010) que demuestran las diferencias entre los oasis Este, Norte y Sur en MZA (Figura 3.5C).

En nuestra investigación, los primeros dos años de experimentación (A-1 y A-2) se realizaron en Luján de Cuyo (oasis norte). En un análisis comparativo con los índices de la ED reportados por Deis et al. (2015) en la misma ubicación, se encontró que bajo condiciones de N_w , el índice obtenido en A-1 se comportó de manera similar, mientras que en el caso de A-2, que fue notablemente más frío que A-1. De este modo, los datos obtenidos para nuestro experimento en A-2 se mantuvieron significativamente alejados de los valores medios de los registros históricos informados por Deis et al. (2015) (Figura

3.5C) para el índice ΣT_{min} . Esto enfatiza la importancia de la variación interanual dentro del mismo sitio durante la ED.

Por otro lado, uno de los objetivos de esta investigación fue alterar artificialmente las condiciones agro-climáticas naturales usando sistemas de calefacción para emular la creación de nuevos escenarios agroecológicos (Tabla 3.1, Figura 3.3, Figura 3.4, Figura 3.5C). De esta forma, calculando el índices presentados por Deis et al. (2015) de ΣT_{min} revelan que el tratamiento AW_w presenta valores más altos en que aquellos observados para N_w para un mismo año (20, 130 y 30% de incremento en A-1, A-2 y A-3, respectivamente). Cabe señalar que en el caso de A-3, los valores registrados para los índices de ΣT_{min} de Deis fueron más altos en N_w y AW_w que los reportados históricamente en la región más cálida de MZA (Oasis Este de la figura 3.5C). Por lo tanto, los entornos creados en el tratamiento AW_w representan un posible escenario si se concretase el calentamiento global predicho para MZA.

El aumento de la temperatura durante la ED puede adelantar la etapa de brotación de la vid, lo que aumentaría el riesgo de daño por heladas (Mosedale et al. 2015). De esta forma, se han reportado variaciones en la fecha promedio de inicio de brotación entre los diferentes oasis productivos de MZA, primero ocurriendo la brotación en el Oasis Norte (Sept-22), seguido por el oasis Este (Septiembre-25) y más tarde Oasis Central (Oct-6) según la DACC. En todos los años analizados en este trabajo, el tratamiento AW_w indujo a una brotación anticipada en las plantas del mismo clon de *Vitis vinifera* var. Mb con respecto a N_w . La diferencia mínima dentro de un mismo año fue de 17 días en el año más frío (A-2) y 32 días en el año más cálido (A-3) (Tabla 3.2).

En el contexto del cambio climático, se esperan alteraciones climáticas que aumenten la T_{min} , disminuyan el número de eventos fríos y aumenten la variación de las

temperaturas en el invierno, pero también se espera una ocurrencia de eventos cálidos y fríos fuera de estación y/o extremos (Salomon et al. 2007, Gu et al. 2008, IPCC 2013, Londo y Kovaleski 2017). Estos cambios pueden tener diferentes consecuencias en los cultivos, como una extensión de la temporada de crecimiento por un retraso en la caída de hojas (Saxe et al. 2001, Hänninen 1991), como además acelerar la brotación de la vid, dejando los nuevos brotes más susceptibles a las heladas (Mosedale et al. 2015). En contraste, la reducción del número de eventos de frío congelante no necesariamente reduce el riesgo de daños, ya que solo un evento puede generar consecuencias en la vid y por lo tanto un perjuicio económico. Por el contrario, el riesgo de las heladas podría hacerse mayor (Meehl 2000, Canell y Smith 1986, Londo y Kovaleski 2017). En bosques caducifolios se demostró que la alternancia térmica marcada diaria durante la primavera es más perjudicial para las plantas que una primavera de temperaturas bajas contantes (Gu et al. 2008).

Nuestro ensayo de AW_w podría ser perfectamente un posible escenario de calentamiento global que demuestra cómo la misma variedad alcanza un nivel de aclimatación menor o una mayor susceptibilidad al daño por congelación. En los últimos 50 años en MZA, varios estudios comparativos corroboraron cambios en los patrones térmicos (Cavagnaro et al. 2014, Deis et al. 2015). El tratamiento AW_w podría corresponderse con las perspectivas anunciadas de aumento de las temperaturas para los próximos años mientras que N_w podría reflejar el momento actual.

La resistencia al frío y su relación con la historia térmica

Tradicionalmente se acepta que durante el invierno la resistencia al frío alcanza un umbral de resistencia máxima que se considera constante e independiente del clima cálido (Proebsting et al. 1980). Este patrón es ampliamente conocido como curva en forma de U, con un punto de máxima resistencia en la base de la curva conocida como nivel máximo de resistencia (MHL) que ocurre durante la mitad del invierno (Zabadal et al. 2007, Proebsting et al. 1980, Beck et al. 2004). Sin embargo, los ambientes donde se cumple este patrón tienen condiciones macroclimáticas donde la T_{min} puede alcanzar hasta los $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la amplitud térmica diaria no exceder los $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la etapa media del invierno (González Antivilo et al. 2017). Bajo estas condiciones, los valores de MHL son alrededor de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tejidos de floema y xilema de $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en sarmientos y troncos de *V. vinifera* (Proebsting et al. 1980, Mills et al. 2006, Cragin et al. 2017).

Existen registros de más de 40 años de información relacionada con la RF en *V. vinifera*. Sin embargo, hay poca literatura que describa el comportamiento de RF de las estructuras permanentes del var. Mb. La Universidad Estatal de Washington cuenta con un monitoreo de la RF en tiempo real para distintas variedades de vid, entre ellas Malbec. Aunque no encontramos publicado en este monitoreo los valores de Mb TL_{50} para comparar con nuestros resultados, los valores de TL_{10} (TL = temperatura letal; 10 = 10 % de daño, temperatura a la cual comenzaron a morir) están disponibles para el último período de invierno (2016-2017) en el Estado de Washington, EE.UU. (<http://wine.wsu.edu/extension/weather/cold-hardiness/>). De este modo, los valores más bajos registrados para floema y xilema fueron $TL_{10-F} = -15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $TL_{10-X} = -25\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. En los tres años de medición en MZA, el valor más bajo de TL_{50-F} fue

de -16 °C (Tabla 3.2), y aunque en algunas mediciones de TL_{50-X} escapó a nuestro rango de medición, en la mayoría de las situaciones evaluadas, a temperaturas inferiores a -19 °C el tejido xilemático ya estaba completamente muerto. Por otro lado, aunque no tenemos la densidad de mediciones de otras publicaciones (nuestros datos se registraron cada dos semanas), no hay un fuerte estancamiento de los datos alrededor de un solo valor de MLH, sino que la RF es variable durante todo el invierno. En el capítulo 2 demostramos que las condiciones ambientales del estado de Washington (EEUU) durante el período de receso son muy diferentes de las de MZA, y que los valores de RF están estrechamente relacionados con la historia térmica de cada región y por lo tanto no son extrapolables, si no que necesariamente se tiene que medir “in situ” (González Antivilo et al. 2017).

Una de las principales características descritas para MZA son la alta amplitud térmica y la alta incidencia de períodos cálidos no estacionales (Caretta et al. 2004, Norte y Simonelli 2016, Gonzalez Antivilo et al. 2017). En este sentido, hay varias investigaciones que respaldan que la RF no es constante, sino que fluctúa dependiendo de las condiciones térmicas del año, por lo menos en plantas perennes (Hubácková 1996, Vitra et al. 2017). Además, la RF máxima no se alcanza automáticamente cada año, sino que depende de la historia térmica a la que está sometida la vid, y que permite o no alcanzar el potencial genético completo de cada cultivar (Schnabel y Wample 1978; Fennell y Hoover 1991, Moran et al. 2011, Londo y Kovaleski 2017). En los 3 años medidos en esta investigación, existen diferencias en el RF como una función de la historia térmica, donde el año más frío registró la mayor resistencia y viceversa con el año más cálido (Tabla 3.2; Figura 3.4)

En Argentina, el “pool” genético del var. Malbec es muy amplio, con una gran cantidad de clones disponibles. Aunque el mismo clon pudo haber sido utilizado en diferentes oasis productivos, las condiciones ambientales pueden ser muy diferentes, lo que dificulta el aislamiento de los efectos del historial térmico sobre RF. Es por ello que este estudio se realizó los tres años con el mismo clon (*Vitis vinifera* cv Malbec clon Perdriel).

En MZA, la frontera agrícola se está extendiendo a través de la implantación de nuevos viñedos sin un conocimiento de la influencia de las características agrometeorológicas sobre la RF de cada cultivar. Los daños de invierno en el tronco de la vid son más comunes en las vides jóvenes (Strik 1992). De hecho, en los oasis Norte y Central de MZA hay registros de pérdidas de plantas jóvenes muertas en algunas propiedades agrícola. Por otro lado estos daño se observa algunos años particulares (experiencia personal y comunicación con jefe de viticultura bodega Chakana Ing. Agr. Facundo Bonamizon y asesor privado Ing. Agr. Ricardo García).

En tres años de experimentación, sometimos plantas jóvenes de var. Mb clon Perdriel en dos entornos térmicos diferentes, controlando las condiciones restantes. Nuestros resultados mostraron que la historia térmica afecta la RF durante la mitad del invierno, siendo N_w el tratamiento más resistente. Sin embargo, esta diferencia en la resistencia del floema se perdió alrededor de un mes antes del comienzo de la primavera; mientras que en xilema, la aclimatación se mantuvo durante un período más prolongado, llegando al final del invierno (Tabla 3.2; Fig. 3.7; Fig. 3.8). La etapa del final del invierno requiere una atención especial porque es precisamente el período del año que experimenta la mayor incidencia de vientos Zonda que generan condiciones de amplia amplitud térmica y que son seguidas generalmente por fuertes heladas (Caretta et al. 2004) y que pueden dañar los tejidos vasculares de los troncos, especialmente el

floema. Existe evidencia de la diferente sensibilidad al frío de los distintos cultivares de las especies frutales (Kadir y Proebsting 1994, Howell 2000). Los tratamientos térmicos generados en esta investigación podrían adaptarse perfectamente a las diferentes zonas vitícolas de la provincia o proponer nuevos escenarios en caso de que se cumplan las predicciones del calentamiento global. Este trabajo fue exploratorio para MZA, siendo el primer estudio de estas características que se realiza en la Argentina.

Es bien sabido que las diferentes variedades de *Vitis sp* tienen diferentes tasas de desaclimatación al final del invierno (Ferguson et al. 2011, Londo y Kovaleski 2017). Por ejemplo, se informa de una pérdida de RF de hasta 5.4 °C a la salida del invierno en *Vitis amurensis*, mientras que *Vitis lambrusca* parece retener la aclimatación durante un tiempo más prolongado a pesar de las temperaturas (Londo y Kovaleski 2017). Del mismo modo, se han informado resultados similares en otros cultivos frutales como el albaricoque, el melocotón y la cereza dulce (Kadir y Proebsting 1994, Howell 2000). Esta diferencia en la tasa de desaclimatación por especie, incluso cultivar, da lugar a seguir trabajando con otras variedades de *Vitis vinifera* en MZA.

Los esfuerzos para interpretar los mecanismos que subyacen a la evolución de RF a través de la ED aún no están del todo claros y no existe certeza sobre cuál es el principal parámetro ambiental que guía este proceso. Varios estudios en *Vitis vinifera* sugieren que la Tmedia del día anterior es el factor principal involucrado en la predicción de la RF (Ferguson et al. 2011, 2013), sin embargo, otras investigaciones no encontraron esta correlación con las temperaturas medias (Badulescu y Ernst 2006). Hubácková (1996) encontró una alta correlación con la Tmedia pero considerando una historia térmica de 15 días. Incluso sus resultados sugieren que Tmax explica aún mejor la RF, mientras que no encuentra correlación con Tmin. Por otra parte, Londo y Kovaleski

(2017) encontraron que la mejor correlación se daba usando la historia térmica de 7 días empleando un índice de temperatura calculado usando temperaturas horarias. Poirier et al. (2010) encontró que la mejor correlación entre la RF de los tallos de nogal y la temperatura se daba considerando la Tmin de 15 días previos al evento de congelación. En nuestro caso, cuando correlacionamos nuestros tres años de medición de RF (en xilema y floema) con diferentes parámetros ambientales, encontramos que Tmax y Tmin fueron los que mejor explicaron la evolución de la resistencia tomando las temperaturas de 1 día anterior (Fig 3.9) Sin embargo, al considerar más días de la historia térmica, la correlación de Tmin con RF aumentó considerablemente (floema: $r_{1\text{day}} = 0.51$; $r_{15\text{day}} = 0.78$; xilema: $r_{1\text{day}} = 0.42$; $r_{15\text{day}} = 0.77$) mientras que al evaluar Tmax, el aumento de días no mejoró la explicación de los valores de RF.

Cambios fisicoquímicos en respuesta al los procesos de aclimatación-desaclimatación al frío

Muchas modificaciones fisicoquímicas cuantitativas y cualitativas pueden ocurrir en respuesta al frío. La mayoría de las especies de plantas acumulan diferentes tipos de solutos compatibles, como AzST y AmLT bajo estrés (Close 1997, Guy 1990). Intentamos analizar juntos el peso de varios de estos componentes en el proceso de aclimatación-desaclimatación. De esta manera, determinamos que AzST están fuertemente relacionados con RF, mientras que CA exhibió una relación más débil. No identificamos ninguna relación de contenido de AmLT y Almidón.

Los AzST constituyen algunos de los solutos compatibles más aceptados por las publicaciones durante los eventos de congelación ya que están involucrados en el

proceso de sobre-enfriado del citoplasma celular (Chen y Li 1977, Hamman et al. 1996, Howell 2000, Badulescu y Ernst, 2006). En *Vitis vinifera*, se han observado que los AzST cambian en concordancia con la aclimatación a temperaturas frías en brotes y sarmientos (Hinesley et al. 1992) indicando que la aclimatación es un proceso dinámico y variable. Así, Keller (2010) sugiere que los AzST alcanzan un pico máximo en la mitad del invierno. Contrariamente a la opinión predominante, AzST no han sido los responsables del estado de RF en muchas especies de plantas; es decir, los niveles altos de AzST no necesariamente coinciden con los aumentos en RF (Stushnoff et al. 1993). Beck et al. (2004) mencionan que en las especies forestales el contenido de azúcar entre una planta aclimatada y no aclimatada puede ser de hasta 4 veces. En nuestra investigación, en tres años de medición, encontramos una estrecha relación entre el contenido de AzST en los dos primeros meses de invierno, pero luego esa relación se debilitó en la última parte de esta estación (Figura 3.10, Tabla 3.2). Además, los niveles de AzST fueron muy variables entre años (Figura 3.10). Esto sugiere que el contenido de AzST varían según las características climáticas de cada año.

El CA también se considera un factor altamente correlacionado con la RF (Howell 2000, Poirier et al. 2010). Encontramos una alta correlación entre el estado RF de los troncos con CA (Tabla 3.4), con valores que van del 45 al 55%. Varias especies reducen el contenido de agua de sus tejidos durante la ED a valores similares a los en nuestro trabajo, presumiblemente para reducir el agua congelable (Chen y Li 1977). Esto también se ha observado en *Vitis vinifera* (Paroschy et al. 1980) y otras especies frutales (Kang et al. 1998). De hecho, Chen y Li (1977) informaron que forzando la deshidratación de un tejido durante un período de 21 días, se registró que se llegó a cuadruplicar la RF.

En cuanto a los AmLT, varias publicaciones sugieren que actúan como solutos compatibles de forma similar a los azúcares solubles, participando en el proceso de super-enfriamiento. Entre ellos, uno de los más citados es la prolina, que se ha descrito como solutos compatibles en muchas especies (Duncan y Widholm 1987, Barka y Audran 1997, Guy 1990). Sin embargo, en nuestro trabajo, aunque observamos una modulación del contenido de aminoácidos durante todo el invierno por las temperaturas, no pudimos establecer una relación clara con la RF.

3.5 Conclusiones

Este es el primer trabajo relacionado con RF en vid realizado completamente en Argentina, y tiene un interés especial por la variedad elegida para abordar el problema. Los dos tratamientos generados podrían representar perfectamente 2 zonas vitivinícolas diferentes dentro de la provincia o plantear nuevos escenarios en relación con el cambio climático, por lo que puede ser una contribución técnica a la zonificación ya que la frontera vitivinícola se está moviendo hacia nuevas áreas que buscan más calidad de uvas pero que son regiones más frías también. Nuestros resultados muestran que la historia térmica, especialmente las T_{min} diarias de los días previos, tiene un efecto sobre RF tanto en el floema como en xilema, pero que un mes antes del inicio de la primavera esta diferencia se pierde. Sin embargo, las plantas en condiciones de AW_w presentan una resistencia muy baja en comparación con el otro entorno (N_w) durante la mitad del invierno, por lo que es más susceptible frente al evento de heladas. Por otro lado, se encontró que los azúcares solubles tienen el mayor peso relativo para explicar la resistencia al frío que otros factores, pero en segundo lugar se debe al CA. En

consecuencia, el manejo cultural del viñedo es fundamental en cada temporada para maximizar la RF y reducir las pérdidas durante la ED, pero también es necesario asociar correctamente el cultivar con la región. Por ese motivo es necesario continuar trabajando sobre la temática en MZA.

Capítulo 4

Una contribución práctica a la viticultura argentina.

Nuevas evidencias de las causas de las brotaciones
heterogéneas al re-inicio del ciclo vegetativo

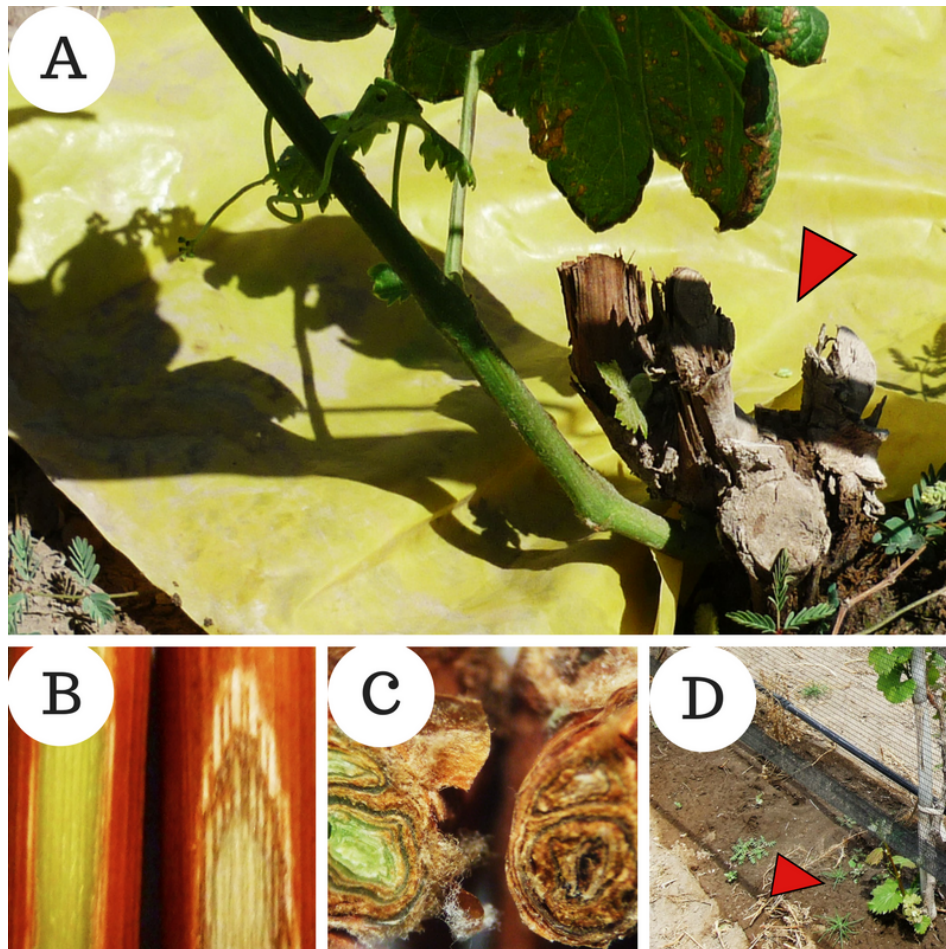
El síndrome DOD

(Daños ocultos de la dormición)

4.1. Introducción

En los primeros años del nuevo siglo productores, técnicos y parte de la comunidad científica de Mendoza dieron cuenta de una problemática vitícola no evaluada con anterioridad y que afectaba una proporción de la superficie implantada que fue lo suficientemente importante como para llamar la atención. Se registraron casos de muerte súbita de plantas de vid al comenzar la temporada de crecimiento (daños terminales; Figura 4.1A). También casos donde moría la parte aérea pero las plantas rebrotaban desde el cuello o solo moría una parte de la planta (daños severos; Figura 4.1B y D). También se encontraron plantas con brotaciones atrasadas y heterogéneas causando fuertes desbalances en las plantas, presentando brotes débiles al final del ciclo (daños leves). De la observación empírica se determinó que los daños predominaron en plantaciones jóvenes, menores a los 3 años, y que podrían encontrarse en plantas adultas, pero con menos frecuencia (Kaiser et al, 2003). Estos autores han observado estos síntomas en variedades como Malbec, Bonarda y Petit Verdot principalmente. A este conjunto de síntomas se lo definió como Crecimiento Deficiente de Primavera o RSG (Restricted Spring Growth). Se ha sugerido que diversos factores tales como otoños benignos, exceso de vigor, riegos abundantes en otoño, suelos arcillosos, y una falta de resistencia a las heladas invernales podrían estar involucrados en la sintomatología (Cavagnaro 2003). Sin embargo, pese a que en dicho informe se constató la ausencia de tilosis en los vasos del leño en las plantas afectadas, hasta el momento del inicio de esta tesis doctoral no se han profundizado investigaciones locales sobre la problemática.

Figura 4.1. Sintomatologías y daños encontrados en vides de la provincia de Mendoza. A) Planta con sucesivas reformaciones a partir de “chupones” de la base del cuello. B) sarmientos o sarmientos con floema vivo (izquierda) y con floema muerto (derecha) visto en un corte longitudinal. C) Yemario de vid vivo (izquierda) y muerto (derecha). D) Planta con falta de brotación en los brazos y con rebrotes en la zona del cuello de la planta. Fotos propias.



Climas Continentales vs. Marítimos: ¿Dos escuelas para los mismos síntomas o afecciones diferentes?

En el Hemisferio Sur, a partir de la década del 90 diversas publicaciones científicas realizadas en países con clima marítimo comenzaron a dar cuenta de brotaciones heterogéneas que afectaban la producción. Dichos trabajos registraron sintomatologías similares a las que se

observan en Mendoza y le asignaron diferentes nombres. De este modo, en Australia se hicieron comunes diferentes términos tales como el anteriormente mencionado RSG (Bernard et al. 2005, AWRI 2010, Cho et al. 2013, Lee et al. 2015) pero además otros como RSd (Enfermedad del Crecimiento Restringido de Primavera o Restricted Spring Disease); (Constable et al. 2003) y SSS (Síndrome del crecimiento corto del brote o Short Shoot Syndrome; Walton 2007, Cho et al. 2013), mientras en Sudafrica difundió el término GAP (Fenómeno de la Detención del Crecimiento o Growth Arrestment Phenomenon; Saayman 1983; Van der Westhuizen et al. 2000, Volschenk et al. 2009).

Se han realizado innumerables esfuerzos para determinar las causas de este síndrome. En Australia se creó una mesa de trabajo (Australian Task Force 1994-1996) que financió investigaciones en el área. No obstante, de las publicaciones resultantes de este financiamiento no quedaron conclusiones claras sobre las causales, pero al menos determinaron la posibilidad de que existiera alguna interacción planta-ambiente que generase un desbalance fisiológico y, por ende, la consecuente brotación heterogénea de la vid. Así para este síndrome se citaron diversos agentes causales como riego y fertilización nitrogenada excesivos lo que generaban una malformación vascular. También se lo atribuyó a falta de agua en el suelo al momento de salida del estado de dormición, o falta de cumplimiento de horas frío, y daños por heladas (AWRI 2010). Sin embargo, otros autores afirman que la causa común para el RSG es de origen biótico, es decir una plaga (Bernard et al. 2005).

Los eriófidos *Calepitrimerus vitis* y *Colomerus vitis* son conocidos como pestes causantes de daños en países como Alemania, Francia, España, Suiza, Italia, Brasil, USA, Japón y Australia, afectando a vides americanas y europeas. También son consideradas como pestes cuarentenarias en muchos otros países como la Argentina. Bernard et al (2005) propone que al momento de hacer conclusiones sobre las causales del RSG se desestimó la importancia

de estas plagas y por error se lo asoció a la pobre aclimatación de las plantas al frío. En algunos viñedos tomados como testigos se llegaron a encontrar más de 500 individuos por órgano evaluado (yemas cerradas y brotes). Siguiendo la línea de trabajo de Australia, algunas publicaciones de Corea del Sur concuerdan con que la sintomatología concordante con RSG se deben a la incidencia de eriófidos. Lee et al. (2015) encontró entre 500 y 5000 individuos por yema de esta plaga. Según Cho et al. (2013) el ataque de eriófidos se ha identificado por primera vez en el Corea del Sur gracias a su trabajo, y la sintomatología corresponde con la descrita para RSG y para SSS. Otro agente biótico que también se asoció a este síndrome es el fitoplasma AGY (Australian Grapevine Yellow; Bernard et al. 2005). No obstante, en plantas de viñedos jóvenes de var. Chardonnay con RSG no se encontró la presencia del fitoplasma (Constable et al. 2003).

Esta problemática ha sido ampliamente estudiada con anterioridad en regiones vitivinícolas de los Estados Unidos desde los años 80'. Uno de los primeros informes de estos síntomas de brotaciones deficientes se atribuyeron a daños en sarmientos, troncos y cordones durante la estación de dormición de la vid y que estos pueden representar desde daños insignificantes hasta el colapso total de la planta en la primavera temprana o hacia el fin de la estación de crecimiento (Ahmedullah 1985). Dicho autor determina que el agente causal de estos síntomas son las heladas invernales y se conocen como “daños por heladas” o “*frost injury*” o “*frost damage*”. En una revisión que integra los resultados de décadas de trabajo, se describe que a pesar de que las plantas afectadas por daños por helada tienen un aspecto normal durante la época de poda, al re-inicio de la estación de crecimiento brotan

heterogéneamente (Stafne 2007). A su vez, se publicó que los diferentes órganos de la planta de vid exhiben diferente resistencia al daño por frío durante la estación de dormición y la de crecimiento (Fuller et al. 1999). Esta resistencia está ampliamente conocida como “robustez al frío” o Cold Hardiness. Más aún, dentro de un mismo órgano, los tejidos pueden tener una resistencia diferencial, como es el caso de floema, cambium y xilema en troncos y sarmientos de vid (Mills et al. 2006). Se ha observado que el xilema es el tejido más resistente, mientras que el floema y el cambium presentan varios grados Celsius menos de resistencia al frío que el primero (Mills et al. 2006, Gonzalez Antivilo et al. 2017, capítulo 2 de esta tesis). Cabe la aclaración que cuando se trabaja con la resistencia al frío en tejidos leñosos, se considera solo a la parte “viva” del xilema, es decir, las células parenquimáticas. Se describen tres niveles de síntomas asociados al daño por frío en troncos y sarmientos durante la estación de dormición: i) daño leve parcial en floema; ii) daño medianamente severo en floema que produce una brotación deficiente y heterogénea; y iii) daño severo en floema y cambium, cuya respuesta de la planta puede ser el rebrote desde la zona del cuello o en el peor de los casos colapsar y morir (Strik 1992, Linden 2002, Fennell 2004, Stefane 2007, Goffinet 2007).

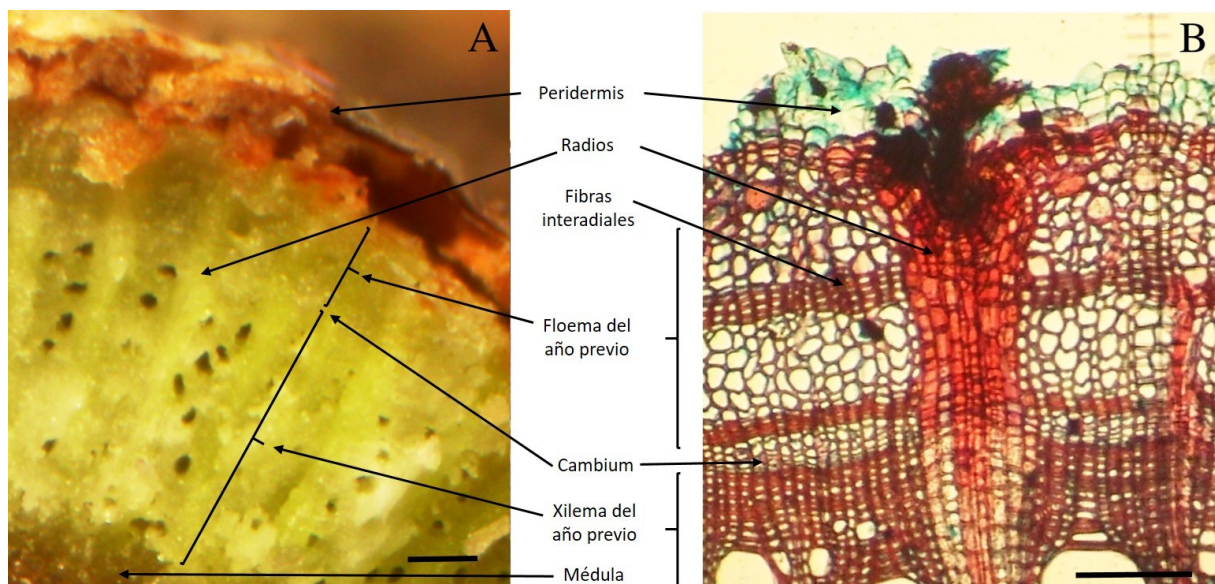
Nótese que los síntomas descritos por estos autores del Hemisferio Norte se corresponden en parte por los que se ha denominado RSG, SSS, RSd, GAP de los autores del Hemisferio Sur. No obstante, estos últimos no toman al daño por frío como eje central de investigación.

El rol clave del cambium en la reactivación de un nuevo ciclo vegetativo en la vid.

La anatomía de un tronco de vid consta de una serie de tejidos concéntricos que se conforman, desde el exterior hacia el interior (Figura 3.2): i) corteza o peridermis, la capa más externa y cumple con la función de aislamiento y protección. ii) Subyacente a este tejido se encuentra el floema, conformado por elementos de tubo criboso con células acompañantes

cuya función es el transporte de savia elaborada y hormonas, pero también por tejido fibroso con funciones de sostén y, por último, por radios floemáticos con funciones de reserva de energía biológica en forma de almidón. iii) Cambium: tejido meristemático secundario compuesto por unas pocas capas de células y cuya función es generar nuevos tejidos conductores ciclo tras ciclo (floema y xilema). El cambium también genera nuevos tejidos como respuesta a eventos traumáticos. iv) xilema, tejido que consta de vasos con funciones de transporte de agua, nutrientes y hormonas, pero también consta de radios xilemáticos con funciones de reservas (almidón) y fibras con funciones de sostén (Esau 1965).

Figura 4.2. Anatomía una sarmiento de vid de 1 año de edad durante la estación de dormición. A) Imagen de una sarmiento viva observada bajo lupa B) Corte anatómico transversal teñido con safranina y observado bajo microscopio en aumento 10×. Barras indican 1 mm y 500 μ m respectivamente. Fotografías propias.



En cada nueva estación vegetativa el floema del año anterior se reactiva por la degradación de calosa, elemento que obtura temporalmente a los elementos de tubo criboso (Esau 1965, Figura 4.3). En forma paralela, ocurre la brotación de la vid, lo cual es condición necesaria

para enviar las señales hormonales que disparen el inicio la activación del cambium (Figura 4.3a). A pocos días de desencadenarse este proceso el cambium se multiplica para iniciar la generación de un nuevo anillo de floema hacia afuera y otro de xilema hacia adentro del tronco (Goffinet 2004). Estos tejidos experimentan un proceso de diferenciación celular antes de ser funcionales (Figura 4.2.b), por lo tanto, al reiniciarse el ciclo vegetativo se solapan temporalmente la actividad del floema formado el ciclo anterior con el recientemente formado (Figura 4.2C y c). Promediando el ciclo vegetativo, el floema viejo es aislado e inactivado por una capa de peridermis formando parte de la corteza (Figura 4.2.D y E). El indicador a campo de esto es que el brote verde cambia de color hacia el marrón y que en el lenguaje vitícola se denomina agostamiento. Después de este momento y hacia el final del ciclo vegetativo, la sarmiento posee solamente una capa de floema activo que es la formada durante ese ciclo y que soporta la fase de dormición y las heladas hasta el siguiente ciclo vegetativo. Esto significa que no importa cuán vieja sea una planta, solo tendrá una fina capa de floema del año activo para conducir todo el material orgánico de la planta y para pasar la estación de dormición (Esau 1965, Goffinet 2007). La acumulación de sucesivas capas floemáticas viejas forman la llamada ritidomis, que se desprende de la planta en forma de tiras.

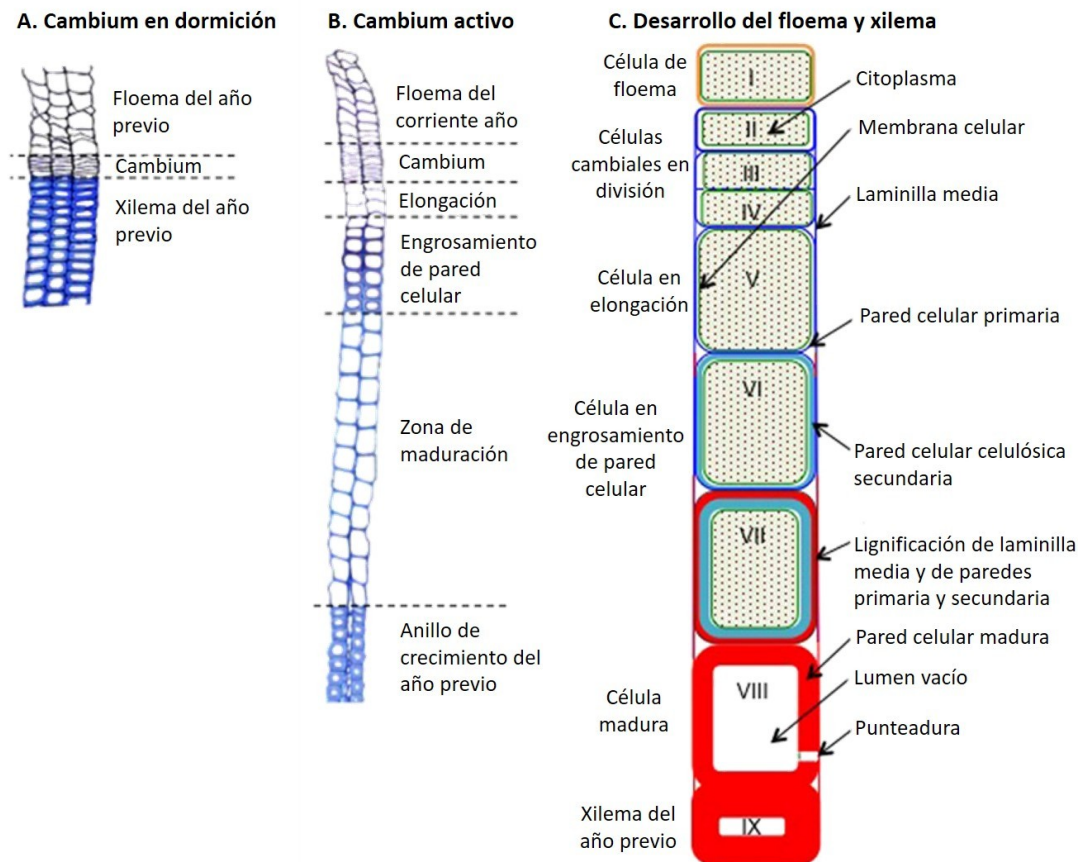
Figura 4.3. Diagrama ilustrando los cambios estacionales del floema en una sarmiento de vid. Tomado de Esau (1965) y adaptado para el Hemisferio Sur. La hoja de vid indica el inicio promedio de la brotación para MZA.



Rathgeber et al. (2016) presentan una extensa revisión en los procesos de la formación de los anillos y la dinámica anual de la actividad cambial. En las plantas de climas templados, el cambium está compuesto por 3 a 6 capas de células (dependiendo de la especie) y no registra actividad celular durante el invierno. Por acción de las temperaturas y la formación de los brotes nuevos al inicio de la estación de crecimiento, el cambium se activa (Esau 1965,

Goffinet 2004, Delpierre et al. 2015, Prislan et al. 2013). Estas nuevas células producidas por el cambium pasan por un proceso de diferenciación celular que se puede dividir en 5 etapas: i) división de las células cambiales madre; ii) alargamiento de las nuevas células formadas; iii) formación de la pared celular secundaria; iv) lignificación; y v) finalización del proceso de diferenciación, constituyéndose en floema y/o xilema activo.

Figura 4.4. Sección transversal esquemática desde la estación de dormición hasta el desarrollo de células radiales de xilema y floema para una especie arbórea de hoja caduca. A) Cambium en dormición durante el invierno compuesto de un fino capa compuesta por 4 a 6 células cambiales, con aspecto de “platos apilados” y ubicados entre el xilema y el floema formado durante la estación de crecimiento previa. B) Cambium activo y filas de células radiales en desarrollo asociadas al inicio del verano. El cambium activo, compuesto por una franja amplia de 11 a 13 células cambiales, exhibe paredes celulares onduladas, está ubicado entre el xilema y el floema recientemente formado. El xilema en desarrollo, el cual está compuesto por una zona de elongación (3 a 4 capas de células), una zona de engrosamiento (7 capas de células) y una zona de maduración (12 a 13 capas de células), está incrustada entre el cambium y el anillo de crecimiento del año anterior. C) Visión esquemática de la capa de fila radial de células xilemáticas y floemáticas: Célula I representa una célula floemática formada recientemente del corriente año; Células II-IV representan las células cambiales en división celular; Células V-VI representan células en elongación; Células VII-VIII representan células en engrosamiento de pared celular (al principio de la lignificación). Tomado y adaptado de Rathgeber et al. (2016)



Si en la etapa invernal, por alguna helada, el floema es dañado, la planta dependerá del floema a formarse en el año, para lo cual es necesario que el cambium se active (Goffinet 2004). Si se daña el cambium, la planta no generará floema nuevo, por lo tanto, no quedará floema funcional para transportar los azúcares y otros materiales orgánicos necesarios para el crecimiento de los brotes.

El objetivo principal de este capítulo fue determinar si el daño por frío podría ser el principal agente causal de las brotaciones heterogéneas registradas en la provincia de Mendoza. Para ello, se caracterizaron las consecuencias de distintos niveles de daños por helada en sarmientos de *V. vinifera* var. Malbec y sus consecuencias sobre la brotación, actividad cambial e integridad anatómica del floema. Se evaluaron las consecuencias productivas a

campo en plantas dañadas por frío en el floema durante la estación de dormición vs. plantas no dañadas. Finalmente, se contrastaron los síntomas observados y los resultados obtenidos con las condiciones ambientales del invierno en cuatro oasis productivos de Mendoza.

4.2. Materiales y Métodos

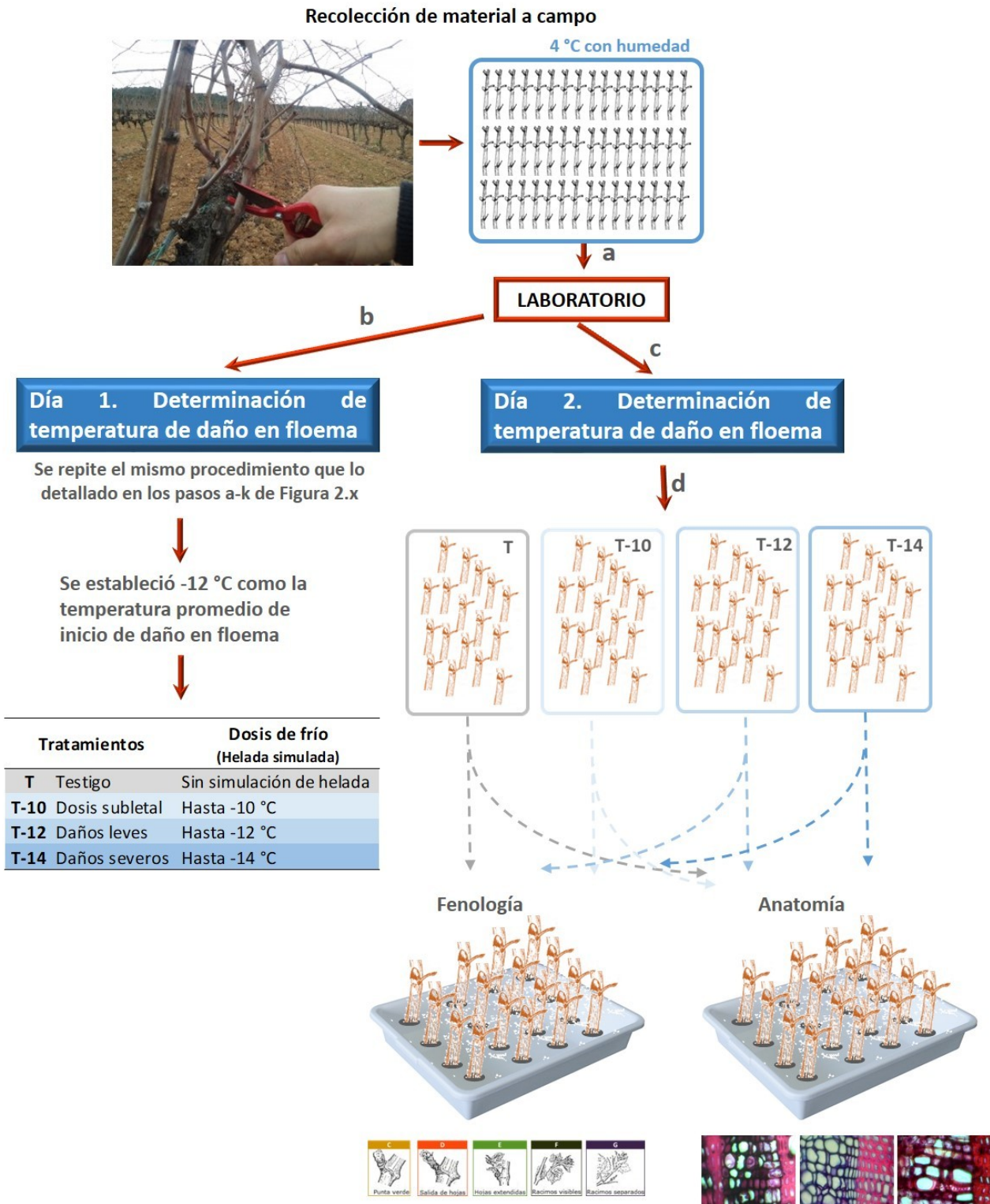
4.2.1. Evolución de la brotación, seguimiento fenológico y consecuencias anatómicas en estacas uninodales de V. vinífera var. Malbec luego de sometidas a distinta severidad de heladas simuladas.

Este ensayo se realizó en el mes de septiembre del año 2015 con estacas uninodales de la var. Malbec clon Perdriel de la finca San Antonio de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo) ubicada en Luján de Cuyo. Luego de la obtención, las mismas se conservaron en bolsas herméticas con papel húmedo para su traslado a las instalaciones de Floralis Lab y IANIGLA CCT-Mendoza, donde fueron procesadas (Figura 4.5a). Con el fin de determinar la temperatura promedio de daño en floema para establecer las diferentes dosis de frío, 10 estacas uninodales de 4 a 5 cm de longitud y con 1 yema cada una se sometieron a una helada simulada tal cual se describió en el capítulo n° 2 (simulación día 1; Figura 4.5b). Con esta simulación, se determinó que la temperatura de daño promedio fue de -12 °C, dato que sirvió para establecer las diferentes dosis de frío de los tratamientos que siguen. Se realizó una nueva simulación de heladas (simulación día 2) donde estacas uninodales de iguales características que en el ensayo anterior se sometieron a distintas temperaturas de daño de floema (Figura 4.5c). Se plantearon 4 tratamientos con 50 estacas para cada uno: i) testigo (T), al cual no se le aplicó la simulación de heladas; ii) temperatura subletal a -10 °C (T-10); iii) temperatura de daños leves a -12 °C (T-12); y iv) temperatura de daños severos a -14 °C (T-14).

El procesamiento de las muestras para la simulación de la helada, así como los parámetros de la misma, fueron realizados de forma similar a lo descrito en el Capítulo 2 de esta tesis. Luego de alcanzar las temperaturas correspondientes para cada tratamiento, las estacas se retiraron del freezer y se fraccionaron para los distintos ensayos: fisiológico (n=20) y otro anatómico (n=30; Figura 4.5d). El total de estacas se dispuso bajo condiciones de brotación (20-25 °C diurnos/10-15 °C nocturnos) en una bandeja con agua (reponiendo su nivel cada vez que fuese necesario).

Para la evaluación de la brotación, sobre las estacas asignadas para este fin se realizaron mediciones diarias de brotación considerando al estado E como inicio de esta etapa fenológica (Anexo 4.6.3; Baggiolini 1952). Las mediciones se realizaron hasta 1 mes después del comienzo del ensayo. Al día 15 desde el inicio del mismo se realizó una medición del estado fenológico de cada una de las estacas. Para la evaluación anatómica, cada 9 días aproximadamente se recolectaron 8 estacas por tratamiento a los fines de observar la evolución anatómica. Para determinar el estado inicial de las muestras, se utilizaron estacas previo a la simulación de la helada. Las muestras se conservaron en la solución fijadora FAA (50% etanol, 5 % ácido acético glacial, 10 % formol, 50 % agua destilada) hasta el momento del corte, tinción y fotografiado.

Figura 4.5. Esquema de la metodología aplicada en el apartado 4.2.1

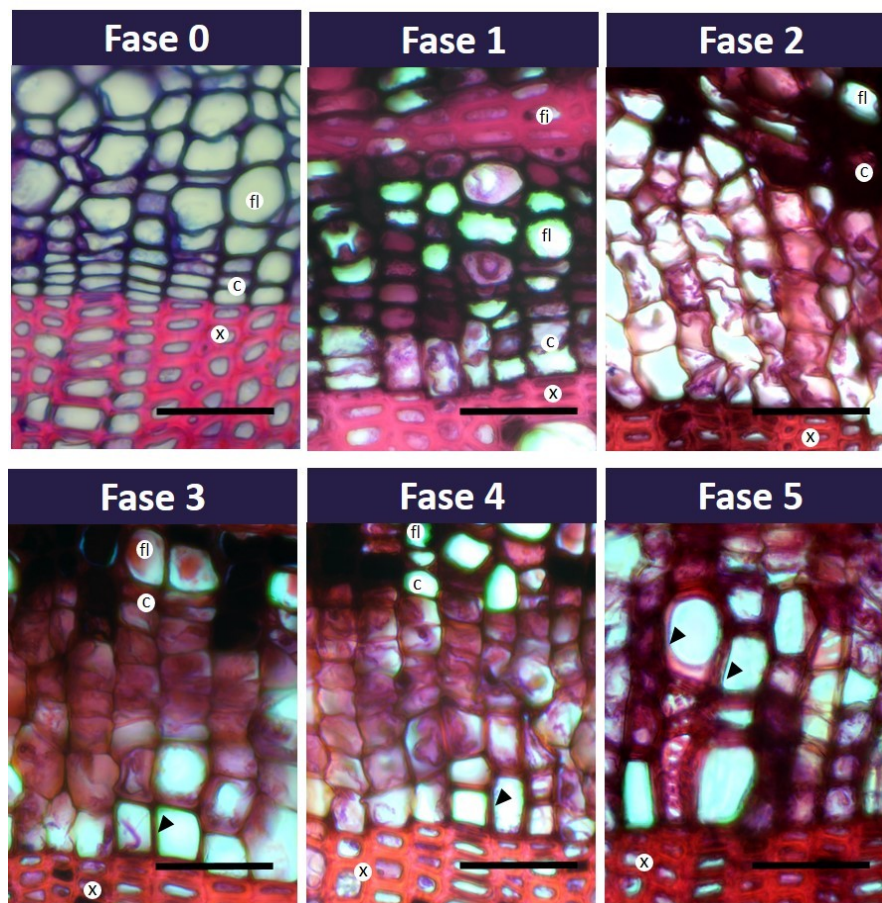


Para realizar los preparados anatómicos las muestras se cortaron con un micrótopo de deslizamiento y se montaron en portaobjeto con glicerina. Previo a la tinción de los cortes se realizó un lavado con agua destilada, y luego otro con hipoclorito de sodio al 50 % durante los minutos necesarios para el blanqueo del material (entre 2 y 5 minutos) y sin que se observen daños en la estructura del mismo. Logrado este objetivo se lavó nuevamente con agua destilada y se secó con papel absorbente. Acto seguido se tiñó con safranina-fastgreen durante 4 minutos. Pasado este tiempo las muestras se deshidrataron con alcohol en distintas concentraciones por periodos de 2 minutos cada una (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% y 100 %). Al final de este proceso las muestras se posaron en acetato de butilo por otros 2 minutos previo al montaje con bálsamo de Canadá en porta y cubreobjetos nuevos. Los preparados montados se secaron en estufa a 40 °C por 48 hs.

Los cortes se foto-documentaron bajo microscopio óptico utilizando los aumentos 10× y 40× y una cámara fotográfica para ocular de 5.1 Mp. El análisis digital se realizó mediante el software ImagePro 4.5. Para hacer el análisis de los resultados, el cambium de las diferentes repeticiones por tratamiento fue clasificado en las distintas fases de actividad según la publicación de Rathgeber et al. (2016) tal como se detalla en la Figura 4.4.

Figura 4.6. Distintas fases de la actividad del cambium entre la estación de dormición y ciclo vegetativo.

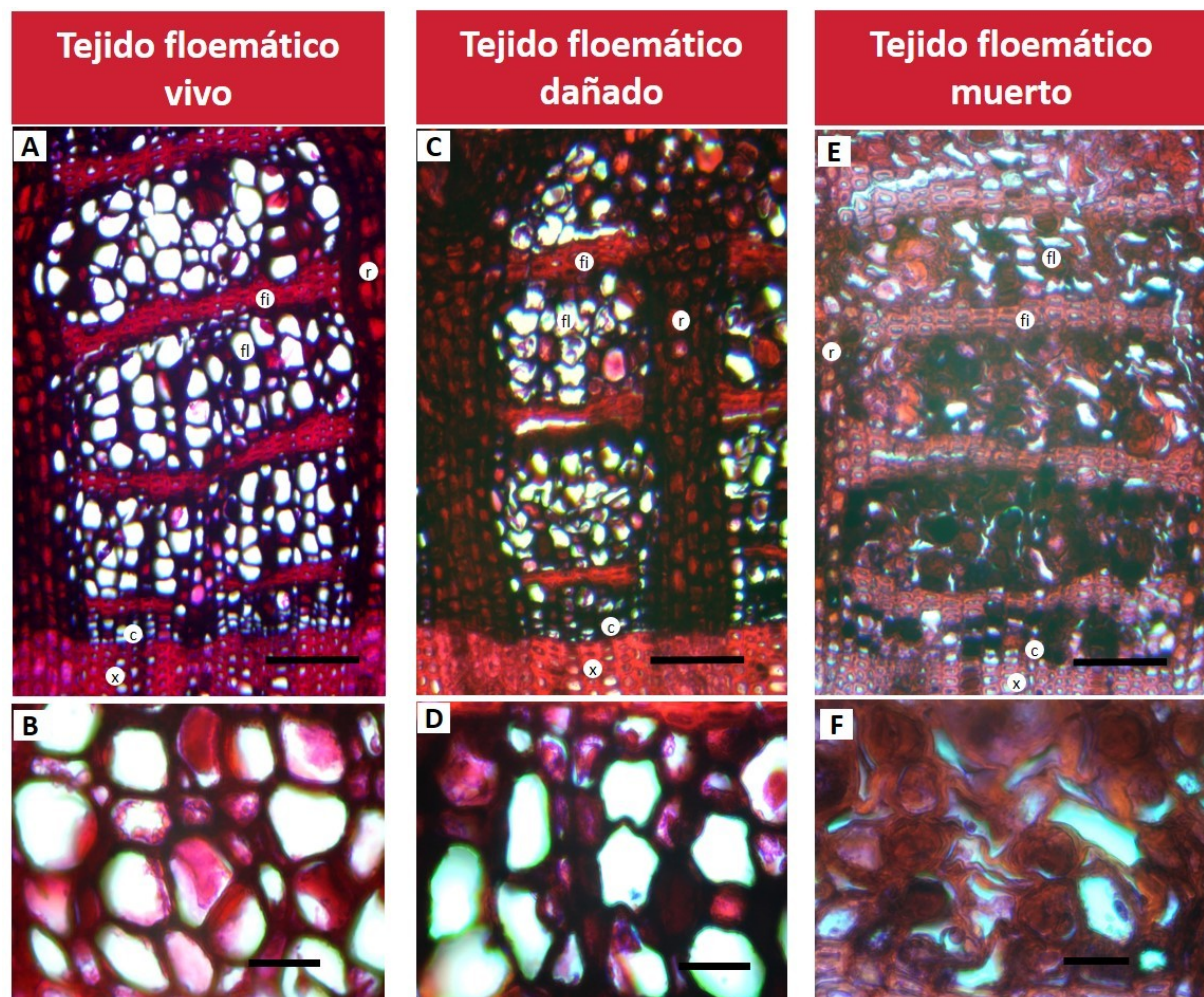
Fase 0: cambium durmiente, sin actividad. Fase 1: comienzo de división celular a partir de las células madres del cambium. Fase 2: Elongación de las nuevas células formadas. Fase 3: Deposición de pared secundaria. Fase 4: lignificación de la pared secundaria. Fase 5: Células funcionales. Aumento 40×, barras indican 200 µm. Fotografías propias. fl = floema; c = cambium; x = xilema.



Para el análisis del estado de integridad del floema, los preparados fueron clasificados cualitativamente utilizando el criterio de clasificación de la Figura 4.7. El análisis se realizó con un n=10 por tratamiento y fecha de muestreo. Se consideró como tejido sano al representado en las fotos A) y B) a lo largo de todo el anillo floemático donde las células del tubo criboso se registraron aproximadamente isodiamétricas. Si en parte del anillo floemático se encontraron células del tubo criboso irregulares y con extremos de punta como en las

fotografías C) y D) se consignaron como tejido dañado. Mientras que sí se observó tejido como los de las figuras E) y F) donde se ha desfigurado y colapsado la forma original de la célula del tubo criboso, este consignó como tejido muerto.

Figura 4.7: Integridad celular del floema en estacas uninodales de Malbec sometidas a diferente severidad de heladas. A), C), E) aumento 10×, donde barras representan 500 μm . B), D), F) aumento 40×, donde barra indica 100 μm . fi = fibras del floema, fl=elementos del tubo criboso del floema, r = radio de floema, c = cambium, x = xilema. Fotografías propias.



4.2.2. Evaluación del momento del comienzo de la actividad cambial y comparación con el avance del ciclo vegetativo de V. vinifera var. Malbec.

Del 21 de julio al 15 de octubre del año 2015 se obtuvieron muestras de estacas uninodales de la var. Malbec de la finca San Antonio de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo) ubicada en Luján de Cuyo. La densidad de muestreo fue de 1 vez por semana. Inmediatamente después de la recolección del material se conservó en FAA y se procesó para las observaciones anatómicas y el equipamiento utilizado fue el mismo que se describió en el experimento 4.1 del presente capítulo. También se utilizó el mismo criterio de clasificación de las fases de actividad cambial presentado por Rathgeber et al (2016) y ejemplificados en la Figura 4.4. Estos datos se relacionaron con el inicio de la brotación en el viñedo.

4.2.3. Evaluación de la respuesta vegetativa y productiva en plantas afectadas por daños en floema en distinta magnitud.

La recolección de la información se realizó en el cuartel D2 con plantas del var. Mb de 4 años de edad de la finca Chakana del departamento Luján de Cuyo, Mendoza. Este cuartel se vio afectado por la helada invernal del día 21 de julio de 2013 que alcanzó una T_{min} de -10.9 °C registrada en casilla meteorológica. Al inicio de la brotación, en el mes de octubre, se marcaron 10 plantas con daños parciales en floema debido a heladas de finales del invierno (se realizó la observación de floema muerto parcialmente a través de cortes longitudinales del tronco). A su vez se marcaron 10 plantas sin afección en floema del tronco para utilizarlas como testigo. Se realizó el seguimiento de las plantas durante la estación de crecimiento y en el mes de marzo del año 2014 se tomaron mediciones a campo y en laboratorio. Se realizó el

conteo de brotes originarios de yemas franca por planta, también se midió la longitud de los mismos en cm con cinta métrica como medida indicativa del vigor y se realizó el conteo de los racimos por planta. Luego de esto se cosecharon los racimos y se embalaron separadamente por cada tratamiento en bolsas plásticas dentro de una caja de telgopor. En el laboratorio de la cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias se realizaron los pesajes correspondientes con una balanza de precisión y los grados brix° se tomaron con un refractómetro. Este trabajo fue hecho en colaboración con el equipo técnico de la DAAC.

4.2.4. Recuento de eriófidos en yemas no brotadas de V. vinifera var. Malbec.

En una finca del departamento de Tupungato (El Peral) implantada con plantas de *V. vinifera* var. Malbec se registró la presencia de brotación heterogénea con yemas ciegas, sin brotar. Se realizó una recolección compuesta de yemas no brotadas pero vivas (según cortes visuales) en el mes de noviembre del año 2016. Se recolectaron aleatoriamente las muestras y se conservaron en bolsas herméticas con papel húmedo que se dispuso en una caja de telgopor hasta la llegada al laboratorio de plagas de INTA EEA Mendoza. Del total de yemas se realizaron 10 sub-muestreos con 3 yemas cada uno al azar.

4.2.5. Mínimas absolutas en 4 oasis de la provincia de Mendoza durante el invierno

Se obtuvieron las temperaturas mínimas absolutas mensuales para el periodo 2007-2017 de la página de la Dirección de Contingencias Climáticas de la provincia de Mendoza (DACC; www.contingencias.mendoza.gov.ar/web1/agrometeorologia). Las temperaturas publicadas corresponden a casillas meteorológicas a 1,4 m con abrigo convencional localizadas en

diferentes propiedades agrícolas. Se descargaron las temperaturas de los meses de julio, agosto y septiembre de 4 zonas representativas de los distintos oasis productivos por su conocida problemática de fuertes heladas. Para el oasis Norte se eligió el distrito de Perdriel en el departamento de Luján de Cuyo, para el oasis centro el distrito de Vista Flores en el departamento de Tunuyán, para el oasis Sur el distrito de Villa Atuel en el departamento de San Rafael y para el oasis Este el distrito de El Mercado en el departamento de Santa Rosa.

4.2.6 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos del capítulo se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo et al. 2017). Las curvas de evolución de la brotación se analizaron mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos, mientras que la comparación de medias se hizo por el método DGC (Di Rienzo et al. 2002) utilizando un valor alfa = 0,05.

El análisis de componentes de cantidad y calidad de racimos, como así también los de vigor de las plantas se realizó por ANOVA con un valor alfa = 0,05.

Para el resto de los gráficos y figuras se realizó una descripción cualitativa que se representó mediante una frecuencia acumulada.

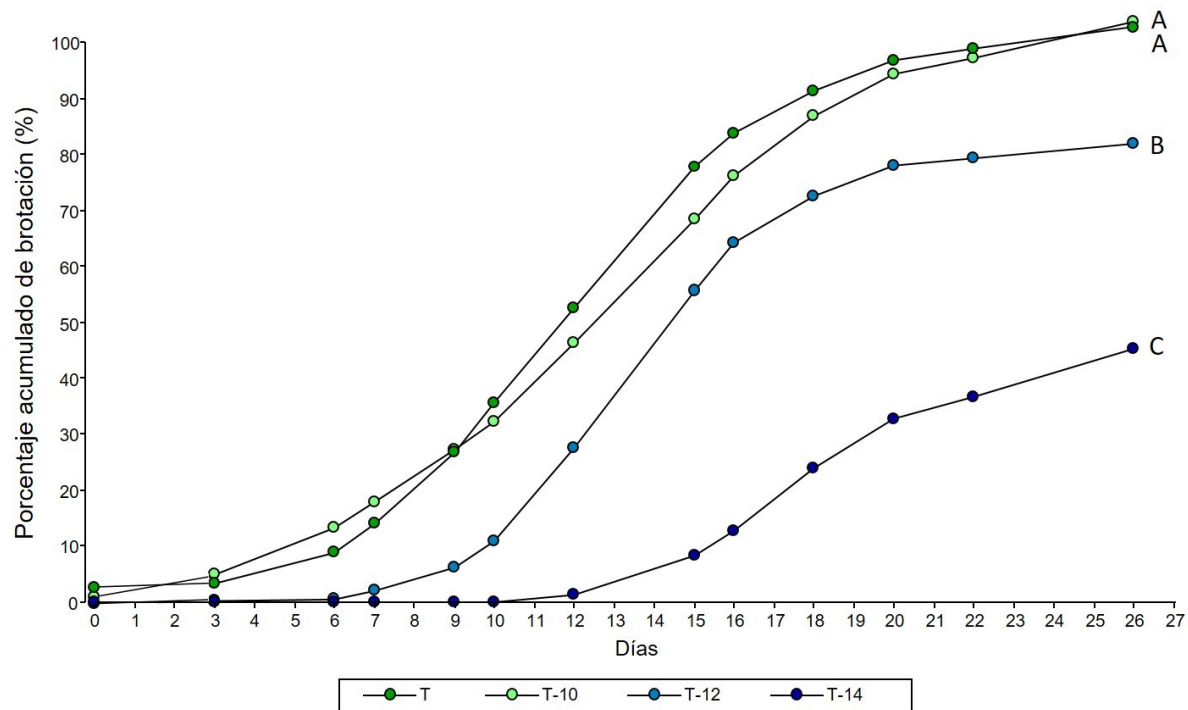
4.3. Resultados

4.3.1. Evolución de la brotación, seguimiento fenológico y consecuencias anatómicas en estacas uninodales de V. vinífera var. Malbec luego de sometidas a distinta severidad de heladas simuladas.

En la Figura 4.8 se puede observar que la brotación del tratamiento T tuvo lugar a los pocos días del comienzo del ensayo, llegando al 50 % aproximadamente al décimo día, y al 100 % al vigésimo día. El tratamiento T-10 siguió un patrón muy similar, de hecho, no hay diferencias estadísticas con respecto a T. Sin embargo, los tratamientos T-12 y T-14 sufrieron una merma en el porcentaje de brotación, alcanzando al último día de evaluación valores de brotación de 80 % y 40 % respectivamente.

En el tratamiento T-12 la brotación comenzó 4 o 5 días después que los otros tratamientos mencionados, y llegó al 50 % de brotación al día 15, es decir, casi una semana después que los tratamientos T y T-10. El tratamiento T-14 mostró una afectación más severa, tanto en el inicio de la brotación como en el porcentaje final de yemas brotadas. El retraso de este tratamiento comparado con T y T-10 fue de casi 15 días. En todos los tratamientos, las yemas que no brotaron se seccionaron y se comprobó que se encontraron vivas.

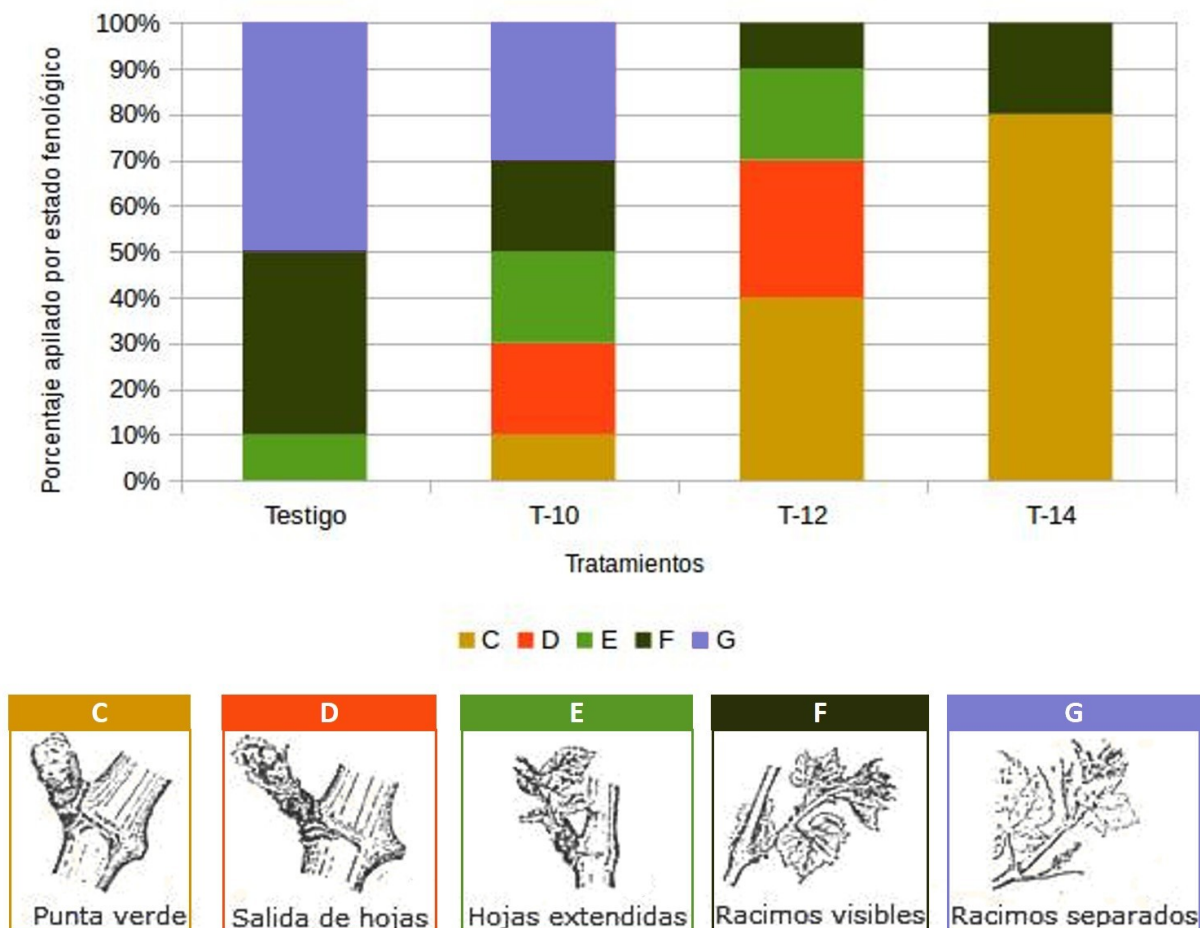
Figura 4.8. Evolución de la brotación en estacas uninodales de *V. vinífera* var. Malbec sometidas a diferente severidad de heladas. T, Testigo sin helada; T-10, temperatura sub-letal de floema a -10 °C; T-12, temperatura de daños leves del floema a -12 °C; T-14, temperatura de daños severos en floema a -14 °C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$).



En la figura 4.9 se observan los estadios fenológicos alcanzados al día 15 para cada tratamiento. Existe una diferencia en el avance de la fenología a momento de la evaluación al comparar los distintos tratamientos. Así en el tratamiento T no solo todas las estacas estaban brotadas, sino que un 90 % de ellas ya se encontraba con racimos visibles o separados (estadios F y G), es decir, en un importante avance de la fenología. En el caso del tratamiento T-10, a pesar de que prácticamente no registró diferencias en la brotación con respecto a T, si se puede observar que el avance fenológico está atrasado, con solo el 50 % de las estacas con racimos visibles o separados (estadios F y G).

En el caso de T-12, si bien registra un importante grado de avance en la brotación, la misma está retrasada fenológicamente, siendo incipiente, y sin exposición de los racimos (estadio C, D y E). Mientras que en T-14, las estacas se encuentran en etapas muy tempranas de la brotación, entre punta verde y primera hoja expandida (estadios C y D).

Figura 4.9. Evolución de la fenología en estacas uninodales de *V. vinifera* var. Malbec sometidas a diferente severidad de heladas al día 15 desde iniciado el ensayo. T, Testigo sin helada; T-10, temperatura sub-letal de floema a -10 °C; T-12, temperatura de daños leves del floema a -12 °C; T-14, temperatura de daños severos en floema a -14 °C. En el panel inferior se indican los estadios fenológicos evaluados según Baggiolini, 1952.

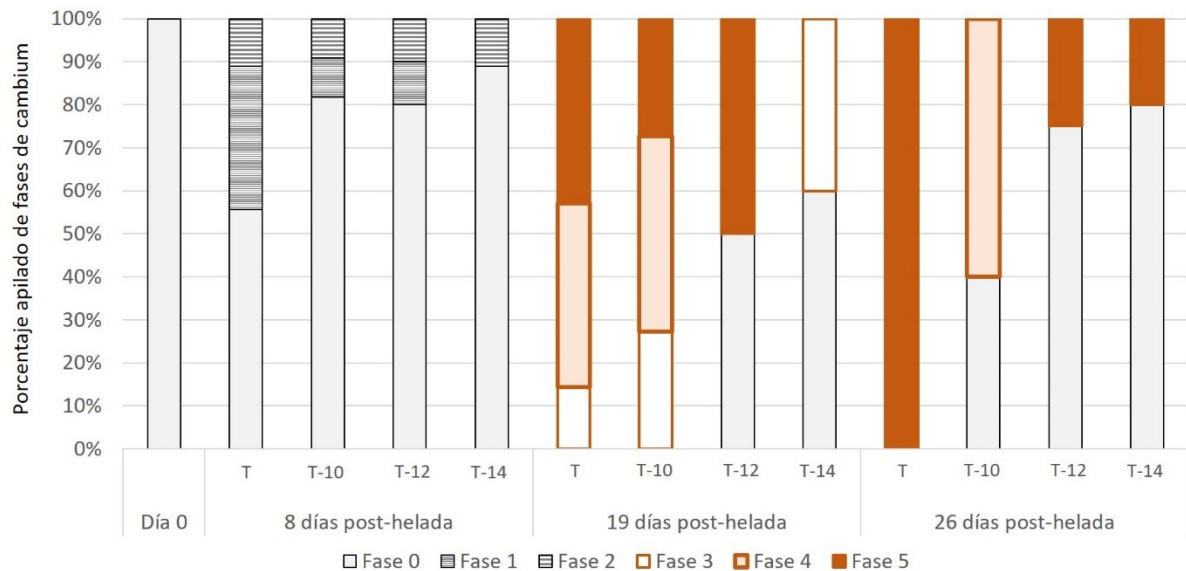


La evaluación anatómica de las fases del cambium en el día de inicio del ensayo, reveló que el mismo se encontraba en estado de dormición, o inactivo (Figura 4.10). Luego de transcurridos 8 días de inducción a la brotación se observó que todos los tratamientos evidenciaron el inicio de actividad cambial, pero en distinta magnitud. Así, los tratamientos T, T-10 y T-12 registraron muestras con cambium en fases 1 y 2 en un 40 %, 20 % y 20 % respectivamente, mientras que en el tratamiento T-14 solamente se registró la fase 2 en un 10

% de las muestras evaluadas. Al día 19 desde la helada simulada se puede observar una evolución similar entre el tratamiento T y el T-10, donde la totalidad de las muestras han superado la fase 3 de actividad cambial y con una gran proporción de las muestras en un estado de avance entre las fases 4 y 5. Sin embargo en los tratamientos T-12 y T-14 se observa una fuerte asimetría. De este modo, en T-12 el 50 % de las muestras evaluadas se encontraron en fase 5 mientras que en T-14 el 40 % se encontraron en fase 4. El restante de las muestras de estos dos tratamientos registró un fuerte retraso en la actividad cambial, encontrándose en fase 0, sin actividad cambial.

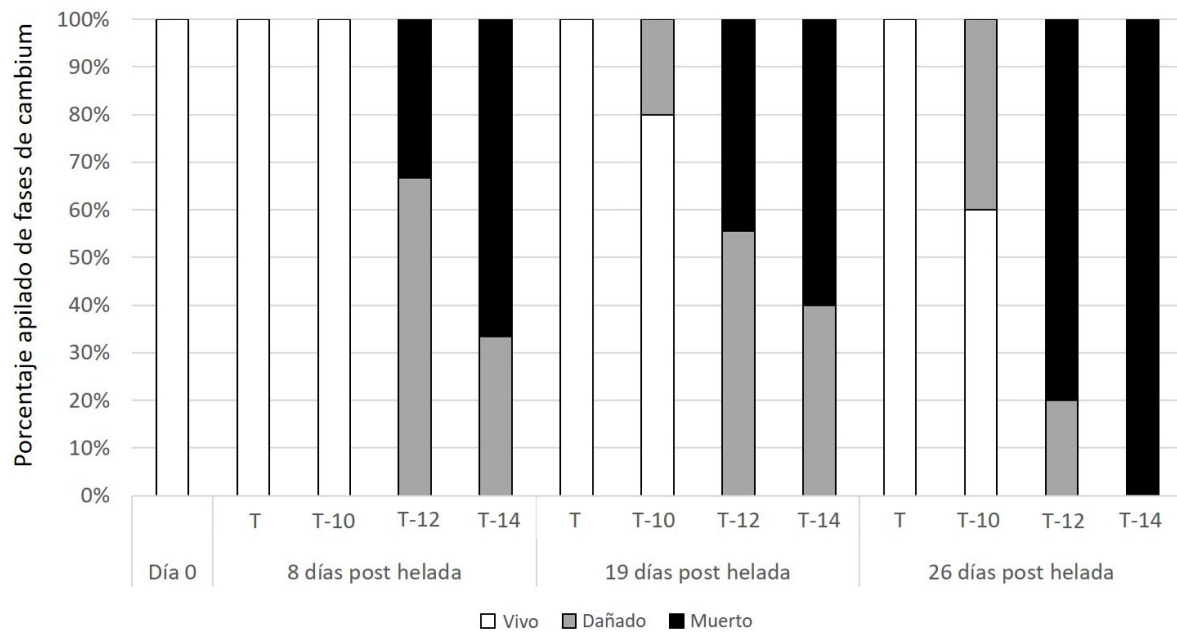
En el último muestreo, a los 26 días de sucedida la helada, el tratamiento T registró el 100 % de las muestras en fase 5, con una intensa actividad cambial con formación de floema y xilema en estado funcional. El tratamiento T-10 presentó un retraso en la evolución del cambium, estando el 60 % de las muestras evaluadas en fase 4, y el restante de las muestras en fase 0. En el caso de los tratamientos T-12 y T-14, solamente el 25 % y 20 % respectivamente presentaron una evolución de la actividad cambial hacia la fase 5, estando el restante de las muestras en fase 0.

Figura 4.10. Evolución de la actividad cambial en estacas uninodales de *V. vinifera* var. Malbec sometidas a diferente severidad de heladas. Las diferentes fases fueron determinadas según lo descripto en la figura 4.7.



En el tratamiento T no se registró daño o muerte del floema en ninguno de los momentos evaluados en este ensayo. Por su parte el tratamiento T-10 se comportó en forma similar a T a los 8 días pos-helada, pero a los 19 y 26 días evidenció 20 % y 40 % de daño en floema respectivamente. En el caso de los tratamientos T-12 y T-14, desde el día 8 ya se evidenciaron daños en el 100 % de las muestras, estas a su vez fueron progresivas con el correr de los días. De este modo, para el caso de T-12, el mismo evidenció un 35 %, 45 % y 80 % de muerte en floema en los días 8, 19 y 26 respectivamente. Por su parte el tratamiento T-14 resultó ser el más severo, mostrando valores de muerte en floema de 65 %, 60 % y 100 % en forma respectiva a los días anteriormente mencionados. En ninguna de las muestras evaluadas anatómicamente se observó daños en xilema.

Figura 4.11. Evolución de la integridad celular del floema en estacas uninodales de *V. vinifera* var. Malbec sometidas a diferente severidad de heladas.

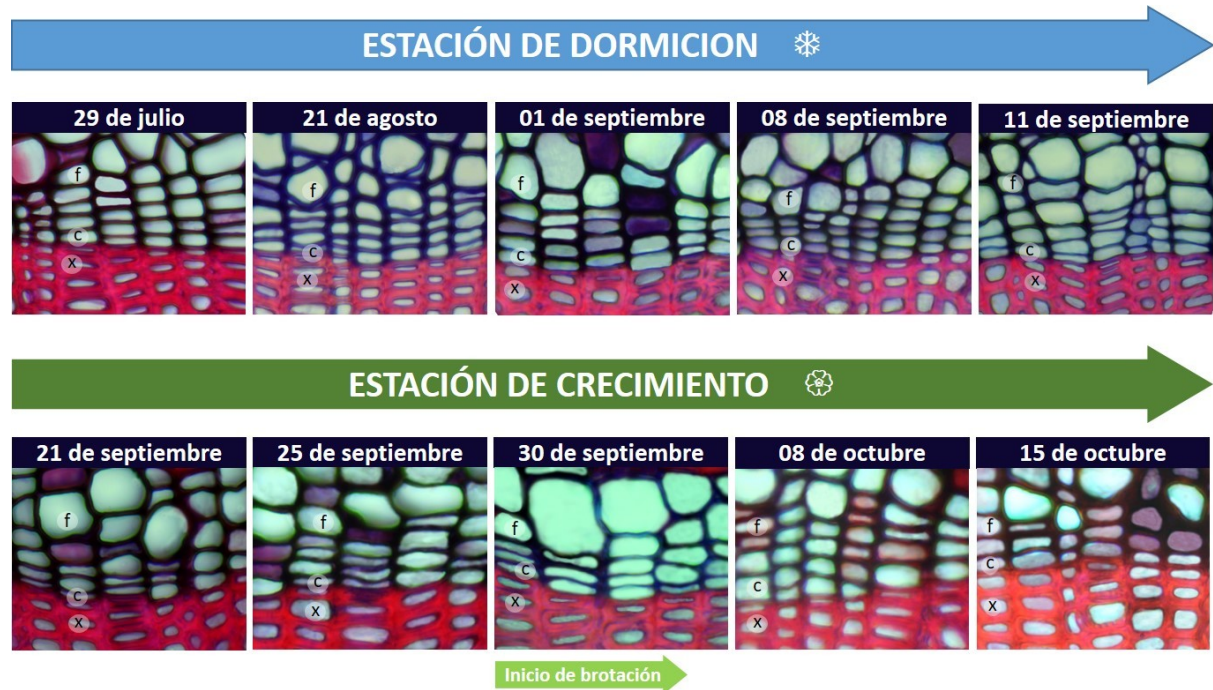


4.3.2. Evaluación del momento del comienzo de la actividad cambial bajo condiciones de campo y comparación con el avance del ciclo vegetativo de *V. vinifera* var. Malbec.

En la Figura 4.12 se puede observar que en las sucesivas mediciones desde el 29 de julio hasta el 15 de octubre en un viñedo (condiciones de campo) no se evidencia actividad cambial. El comienzo de brotación se observó para el 22 de septiembre, mientras que 10 días después se describió el avance de la brotación con un 100 % en las plantas evaluadas. Al momento del último muestreo, los brotes se encontraban en los estadios E y F. De este modo, no se registra actividad cambial hasta después del inicio de la brotación, indicándose que en este momento las plantas contienen una única capa floemática proveniente del anterior ciclo vegetativo.

Figura 4.12. Evolución de la actividad cambial durante el final de la estación de dormición y el comienzo del ciclo vegetativo en plantas de *V. vinifera* var. Malbec implantadas a campo en la estación experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Luján de Cuyo, Mendoza.

f = floema; c = cambium; x = xilema. Fotografías propias.



4.3.3. Evaluación de la respuesta vegetativa y productiva en vides bajo condiciones de campo afectadas y no afectadas por daños en el floema como consecuencia de una helada invernal.

En el presente capítulo también se evaluaron las consecuencias agronómicas de una brotación heterogénea debido a daños en floema provocados por una helada de invierno tardío. En el mes de agosto se registró en casilla meteorológica convencional la temperatura de -10,9 °C en la finca donde se realizaron las evaluaciones. Sin embargo, no se cuenta con la temperatura del cuartel, pero si se sabe que es el más bajo de la finca, y que frecuentemente se manifiestan daños allí. En la Tabla 4.1 se puede observar importantes diferencias entre el vigor de las plantas con Floema Dañado y las plantas Testigo (que mantuvieron su conexión

vascular intacta). En primer lugar, se registró una diferencia relativa de 64 % a favor del Testigo en la brotación de yemas francas entre los dos tratamientos. También se registraron importantes diferencias en la longitud de brotes emergidos de estas yemas, llegando a alcanzar una brecha de aproximadamente 5 veces, siendo mayor las del tratamiento Testigo. En resumen, las plantas afectadas en el floema por las heladas registraron una importante pérdida de vigor.

Tabla 4.1. Comparación de la respuesta vegetativa de las plantas afectadas por una helada y con daños en floema (Floema Dañado) contra plantas sin daño en floema (Testigo) al finalizar el ciclo vegetativo (mes de marzo) en viñedo implantado con *Vitis vinífera* var. Malbec ubicadas en Luján de Cuyo, Mendoza. Temporada 2013-2014. Trabajo hecho en colaboración con DACC. Brotes YF/planta indican la cantidad de yemas francas por plantas.

Variable	Tratamiento		
	Testigo	Floema dañado	Significancia
Brotes YF/planta	9,2 + 0,8	5,6 + 0,8	p =0,0059
Largo de brotes (cm)	93,5 + 4.5	19,2 + 3,9	P < 0,001

Con respecto a parámetros de rendimiento y calidad de uva, se observa que la cantidad de racimos que registró el tratamiento Testigo es aproximadamente un 50 % superior a los que se contaron en las plantas con Floema Dañado (Tabla 4.2). Además, se puede observar en la misma tabla que existieron cambios drásticos en el peso de los racimos, promediando más del doble para aquellos provenientes de las plantas Testigo. También es destacable la diferencia en la cantidad de granos entre uno y otro tratamiento. Así, se registró cerca del 90 % más de granos en los racimos de las plantas Testigo que en los racimos de plantas con Floema Dañado. Sin embargo, aunque fue estadísticamente diferente la cantidad total de granos, el impacto fue de solo el 15,9 %.

Por otro lado, se midió la variable peso de raquis como una valoración indirecta del tamaño del racimo. Se registró que las plantas con Floema Dañado presentaron raquis con una reducción en peso del 35 % con respecto a las plantas Testigo, implicando un menor tamaño de racimo. De este modo, la producción de las plantas con Floema Dañado se caracterizó por tener racimos más chicos y más livianos, principalmente debido al menor número de granos.

Para finalizar también se midió el contenido azucarino como una medida de calidad de la uva, siendo menos azucaradas las provenientes de plantas con floema dañado. Pese a que la diferencia relativa fue de solamente el 3,1 %, la diferencia absoluta fue de aproximadamente 1 ° Brix.

En conclusión, las plantas afectadas por daños en floema debido a una helada tienen menos brotes de yemas francas y más cortos, lo que determina menos calidad y cantidad de uva.

Tabla 4.2. Comparación de la producción de plantas afectadas por daños en floema (Floema Dañado) contra plantas sin daño en floema (Testigo) al finalizar el ciclo vegetativo (mes de marzo) en *V. vinifera* var. Malbec bajo condiciones de campo, ubicadas en Luján de cuyo, Mendoza. Temporada 2013-2014. Trabajo hecho en colaboración con DACC.

Variable	Tratamiento		
	Testigo	Floema dañado	Significancia
Racimos/planta	12,6 + 0,2	8,1 + 0,3	p < 0,001
Peso racimos (g)	93,8 + 4,7	43,9 + 6,1	p < 0,001
<i>Peso total granos (g)</i>	90,3 + 4,5	41,8 + 5,9	p < 0,001
<i>Peso de los granos (g)</i>	1,46 + 0,02	1,26 + 0,03	p < 0,001
<i>Cantidad de granos/racimo</i>	60,6 + 2,9	32,1 + 3,8	p < 0,001
°Brix	23,3 + 0,1	22,6 + 0,1	p < 0,001
Peso raquis (g)	3,4 + 0,2	2,1 + 0,2	p < 0,001

4.3.4. Recuento de eriófidos en yemas no brotadas de *V. vinifera* var. Malbec.

El conteo de este eriófido en yemas no brotadas vivas reveló la no presencia de ningún tipo de eriófidos (Tabla 4.3). En la misma visita a campo, en las plantas con síntomas de brotación deficiente o heterogénea se buscaron síntomas de russeting o cicatrices en los brotes de crecimiento débiles sin embargo no se encontraron tales síntomas, que son los principales indicadores de la plaga según la bibliografía. Por otro lado, la inspección visual en yemas brotadas a lo largo de toda la propiedad tampoco evidenció síntomas típicos de la plaga. A pesar de que este fue el único análisis de laboratorio de este tipo realizado durante la tesis, la inspección visual en busca de la plaga ha durado más de 3 años no observándose sintomatología descrita en la bibliografía a excepción de escasa veces que se observó

depresiones tapizadas por una felpilla en hojas adultas aisladas, pero en ningún caso con alguna incidencia económica. Además, estos síntomas se observaron hacia el final del ciclo vegetativo. Según lo consultado para esta tesis al personal técnico de SENASA y el laboratorio de Fitopatología del INTA EEA Mendoza (comunicación personal Ing. Agr. Eugenia Herrera) *Colomerus vitis* está registrado en nuestro país como una plaga pero que no han registrado casos de daños económicos de importancia. Según el SINAVIMO (sistema nacional de monitoreo de plagas) los daños se producen en hojas solamente, y la información sobre esta plaga es escasa debido a su poca incidencia en el cultivo de la vid.

4.3.5. Mínimas absolutas en 4 oasis de la provincia de Mendoza durante el invierno

En base a los resultados de tres años de mediciones de resistencia a frío arrojados en el Capítulo 2 de esta tesis, se establecieron probables valores de temperaturas de daño de floema en *V. vinifera* var. Malbec clon Perdriel. Los mismos fueron establecidos en -10 °C, -8 °C y -6 °C para los meses de julio, agosto y septiembre respectivamente. Estos umbrales fueron comparados con las mínimas históricas del periodo 2007-2017 registradas en diferentes oasis productivos (Tabla 4.3). Con este análisis, se observa que en todos los oasis productivos en el periodo considerado se han registrado temperaturas mínimas absolutas que podrían causar daño en la vid (temperaturas resaltadas en azul en la Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Temperaturas mínimas absolutas durante el invierno en 4 oasis productivos de la provincia de Mendoza durante el periodo 2007 al 2017. Se encuentran marcadas en azul las temperaturas de probable daño en floema de troncos de vid jóvenes o sarmientos, en base a los resultados obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis. Registros tomados de la base de datos histórica de la DACC

Julio – Mitad del invierno				
Año	Norte (Perdriel)	Centro (Vista Flores)	Sur (Villa Atuel)	Este (Santa Rosa)
2007	-10,3	-	-	-12,1
2008	-5,3	-	-	-5,2
2009	-8,4	-4,2	-8,9	-8,4
2010	-8,9	-7,5	-9,8	-11,8
2011	-9,7	-12,1	-10	-14,6
2012	-8,8	-9,2	-8,9	-9,8
2013	-11,3	-12,2	-9,4	-9,6
2014	-7,8	-10	-8,7	-10,6
2015	-6,5	-9,2	-7,4	-8,4
2016	-3,6	-5,4	-4,6	-5,7
2017	-8,3	-4,3	-	-11,6

Agosto – Mitad del invierno				
Año	Norte (Perdriel)	Centro (Vista Flores)	Sur (Villa Atuel)	Este (Santa Rosa)
2007	-7,2	-	-	-9,2
2008	-5,3	-	-	-5
2009	-5	-3,1	-6,2	-4,9
2010	-8,2	-6,8	-7,5	-8,8
2011	-7,2	-5,2	-6,4	-14,5
2012	-6,7	-2,6	-7,1	-8
2013	-7,7	-7,9	-7,5	-7,1
2014	-7,2	-8,5	-6,9	-11,6
2015	-3,5	-4,8	-3,9	-3,5
2016	-3,5	-3,7	-4,3	-4,5
2017	-5	-4,6	-	-5,3

Septiembre – Salida del invierno				
Año	Norte (Perdriel)	Centro (Vista Flores)	Sur (Villa Atuel)	Este (Santa Rosa)
2007	-1,5	-	-	-3,9
2008	-2,2	-	-	-2,2
2009	-4,2	-1,3	-4,8	-3,8
2010	-1,4	-1,4	-0,8	-1,2
2011	-4	-4,6	-3	-8,8
2012	-1,3	-2,1	-0,8	-2,3
2013	-4	-5,2	-4,6	-5,7
2014	-2,6	-2,9	-1,3	-2,3
2015	-4,6	-7,3	-5,8	-2,8
2016	-5	-5,3	-4,9	-7,1
2017	-3,5	-2,5	-	-3,2

En base a estos resultados, se observa que la probabilidad de ocurrencia es de tipo estocástica y depende de las características particulares de cada año y región. No obstante, se puede observar que la probabilidad de incidencia de heladas potencialmente peligrosas es mayor en algunos oasis productivos que en otros, tal como puede observarse en la Tabla 4.4. Se nota claramente que los oasis Este y Centro son de mayor riesgo a lo largo de toda la época de receso invernal. Por su parte, el oasis Norte tiene una probabilidad menor que los oasis anteriormente mencionados, con riesgo nulo en septiembre. Según estos datos, el oasis Sur es el menos vulnerable a este tipo de contingencia.

Tabla 4.4. Probabilidad porcentual de daño en floema de *V. vinifera* var. Malbec por helada para 4 oasis productivos de Mendoza en el periodo 2007-2017.

Mes	Oasis productivo de Mendoza			
	Norte (Perdriel)	Centro (Vista Flores)	Sur (Villa Atuel)	Este (Santa Rosa)
julio	18 %	27 %	9 %	45 %
agosto	9 %	9 %	0 %	36 %
septiembre	0 %	9 %	0 %	18 %

4.4. Discusión

En el presente capítulo quedó demostrado que según el grado de severidad que alcanza una helada se relaciona con distintos niveles de daños en floema y su consecuente afección de la brotación (Figura 4.8). De este modo, mientras a temperaturas sub-letales no se registran daños o estos son muy leves, cuando se alcanza o supera el umbral de resistencia de las células del floema se observó un avance en la pérdida de integridad en el floema que se corresponde con el retraso de 1-2 semanas en la brotación o su ausencia en el peor de los

casos (Figuras 4.8, 4.9, 4.10, 4.11).

Tal como vimos en el capítulo 2, los órganos tienen distinta resistencia al frío, siendo las yemas durmientes (estado fenológico A según Baggiolini) unos de los estadios con mayor resistencia solo superado por el xilema que raramente se muere (Pierquet y Stushoff 1979, Brusky Odneal 1984, Howell y Shaulis 1980, Mills 2006, Cragin et al. 2017, Gonzalez Antivilo et al. 2017). De este modo, las yemas raramente pierden el suministro de agua y nutrientes. Por el contrario, el floema está ubicado más exteriormente en los órganos y sometido a mayores fluctuaciones de la temperatura del aire, además de poseer una menor resistencia intrínseca del tejido, siendo frecuentemente dañado por las heladas invernales (Mills et al. 2006). Esto puede llegar a ser un problema cuando hay altas amplitudes diarias debido a que pueden favorecer la desaclimatación de los tejidos (Goffinet 2007, Gonzalez Antivilo et al. 2017). Cuando hay daños en este tejido, se afecta el movimiento activo de carbohidratos, debido a que se registran daños tanto en las células del tubo criboso como en las células acompañantes (Figura 4.7). Dependiendo de la masividad del daño en este tejido, es que se puede considerar plausible que el retraso en la brotación o el lento crecimiento de los brotes se deba a un desabastecimiento energético.

Así, al iniciar el periodo de crecimiento con el aumento de las temperaturas, las plantas afectadas por daños por frío en floema pueden iniciar la brotación, pero debido a lo anteriormente dicho estos brotes son débiles o incluso pueden colapsar, lo que conlleva al retraso fenológico (Figura 4.9, Tabla 4.1). En casos mas severos de daño masivo, la planta colapsa y la brotación no ocurre.

Otro tejido que puede verse dañado según la severidad de la helada es el cambium, tejido meristemático encargado de la generación de los tejidos conductores año tras año. Existe escasa información acerca de las consecuencias y evolución de los tejidos a nivel anatómico luego de una helada en la *Vitis vinifera*. Uno de los pocos trabajos dedicados a la temática

fue realizado por Goffinet (2004, 2007) donde el propone que luego de un evento de helada, las células sobrevivientes del cambium formarían un tejido desorganizado que desarrollaría un callo de reparación que se esparciría en forma de cuña al rededor del anillo. Según este autor, el retraso en la brotación se debe a este proceso, y dependiendo de la masividad del daño la reparación podría ser rápida, o tomar varios días, e incluso nunca suceder. No obstante, en este capítulo no se observó la formación de dicho callo, incluso transcurrido el momento de inicio de la brotación pero si una actividad cambial del año pero con un desarrollo heterogéneo o nula a lo largo del anillo según la severidad del daño (Figuras 4.10 y 4.11). Este daño en el cambium y en el floema se correlacionan con la respuesta observada a nivel de brotación y fenología.

La planta de vid posee una susceptibilidad especial al daño en el floema, ya que debido a su fisiología pasa la estación de dormición con una sola capa de anillo floemático formado en el ciclo vegetativo anterior (Figura 4.3, Esau 1968). La funcionalidad de este anillo floemático es reactivada al comenzar el nuevo ciclo vegetativo, sin embargo, para este momento el cambium todavía no está activo (Figura 4.12). Esta capa de tejido conductor es la encargada de reabastecer energéticamente las yemas activadas al inicio de la brotación. Si existiera un daño como consecuencia de una helada invernal, este proceso se interrumpe. Para que este suministro se reestablezca, es necesario esperar que el cambium se active y genere el nuevo floema del año siempre y cuando el meristema esté intacto. Sin embargo, esta activación es mediada por la brotación ya que las hojas son las encargadas de enviar las señales hormonales para que esto suceda (Goffinet 2007). Si los daños en floema son débiles o moderados se verán los síntomas de retraso y heterogeneidad de la brotación, siempre y cuando el cambium pueda ejercer su efecto reparador. Pero si además del floema, el cambium también es dañado durante la estación de dormición, la imposibilidad de generar un nuevo tejido conductor sumado a la particularidad de poseer solo 1 anillo de floema podrían

determinar las consecuencias que se ven a campo. Esta podría ser la causa del colapso general de la planta observada al inicio de la estación de crecimiento, cuyo síntoma característico es la muerte de los troncos con rebrote de las yemas bajo el suelo, ya que es una zona protegida de las bajas temperaturas y que conserva la conexión vascular (Gonzalez Antivilo et al. 2017, Capítulo 2).

Estos efectos fueron corroborados en ensayo a campo en plantas que presentaron daños luego de una helada presentados en este capítulo (Tablas 4.1 y 4.2). Existe amplia información sobre las consecuencias de las heladas invernales sobre la viabilidad de yemas, que se utiliza como referencia para estimar las pérdidas debido a estas contingencias (Pierquet y Stushnoff 1980, Pratt y Pool 1981, Wample y Wolf 1996, Wolfe 2000). No obstante no se encontraron trabajos que registrasen las consecuencias agronómicas de las heladas invernales hacia el final del ciclo vegetativo, por lo cual no se pueden contrastar con los datos obtenidos para esta tesis. Al medir las consecuencias en el vigor y en la producción de la vid var. Malbec (Tabla 4.1, 4.2) se observan severos daños en el crecimiento de los brotes, que a la larga tendrán consecuencias en el material de poda y en las reservas de foto-asimilados del año entrante. Por otro lado se afecta la producción tanto en cantidad como en calidad, los racimos registrados fueron más chicos, más livianos y menos azucarados (Tabla 4.2).

Brotación deficiente de la vid: un mismo síntoma, diferentes causas

Tal como se describió a lo largo de este capítulo, diferentes agentes causales pueden afectar la brotación de la vid. Una de las causas citadas es la presencia de eriófidos en yemas. Estos micro-artrópodos atacan las yemas de la vid antes de la brotación produciendo su muerte y consecuente brotación deficiente (Lee et al. 2015, Cho et al. 2013). No obstante, la presencia de esta plaga está asociada con otros síntomas muy característicos tanto en brotes, hojas y

racimos, generando un tejido cicatrizal o “russeting” y un “bronceado” (Anexo 4.6.4; Lee et al. 2015). Además, en un ataque específico de eriófido, se observan brote en zig zag con entrenudos cortos; hojas adultas con deformaciones y agallas y una distribución espacial en rodales (Walton 2009). Como la plaga es ectópica, en ningún caso afecta tejidos internos de las estructuras permanentes de la planta. La detección se puede hacer “in situ” con el auxilio de una lupa de mano en el viñedo o en laboratorio con técnicas especiales de detección y conteo..

En Argentina, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) a través de su Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitorio de Plagas (www.sinavimo.gob.ar) tiene constancia de la presencia de estos eriófidos en el país, y lo define como el causante de la erinosis de la vid que puede causar como único síntoma la formación de agallas en hojas adultas. En todas las observaciones a campo que se han realizado a lo largo de esta tesis, este síntoma se ha observado a campo con una frecuencia muy baja, y además solamente en hojas adultas avanzada la fase de crecimiento, reforzando lo descripto por SENASA.

Otro conjunto de factores que pueden derivar en una brotación deficiente son los desbalances productivos/vegetativos (Walton et al. 2009). A esta afección también se la ha denominado RSG, lo que conllevó a una mayor confusión de los síntomas y las causas. Tal como se mencionó en la introducción de este capítulo, las causas originales de deben mayoritariamente a cuestiones de manejo de viñedo (AWRI, 2010). Para descartar si el cultivo está sufriendo un desbalance fisiológico se puede recurrir al uso de índices que han sido desarrollados para tal fin. Uno de los más utilizados en la actualidad es el índice de Ravaz que relaciona la cosecha con el peso de poda (Ravaz, 1903). No obstante, cuando un viñedo está mal manejado, los síntomas de desbalance suelen ser uniformes a lo largo del cultivo. En este caso, en forma similar a lo que ocurre con los eriófidos, los desbalances nutricionales no

afectan los tejidos internos de las estructuras permanentes.

El daño por frío también ha sido asociado con los síntomas de brotación heterogénea de la vid, principalmente cuando ocurren heladas durante la estación de dormición (Wolfe 2000, Goffinet 2007). Al contrario de la distribución espacial asociada a los daños por eriófidos o desbalances fisiológicos, los daños por frío tienen una distribución aleatoria, que puede variar drásticamente entre plantas contiguas o incluso en una misma planta (Walton et al. 2007). Las vides afectadas por el frío en las estructuras permanentes manifiestan los síntomas recién al reiniciar el ciclo vegetativo (Figura 3.1; Goffinet 2005). Cuando el daño es debido al frío durante la estación de dormición no se encuentra tejido cicatrizal en los brotes, ni deformaciones (Walton et al. 2009).

Explorando las causas de las brotaciones heterogéneas en Mendoza

Según Kaiser et al. (2003) el frío invernal en las condiciones habituales de la región de Cuyo (Mendoza – San Juan) por si solo no es limitante para la supervivencia de las vides. Esto se consideró debido a que la región cuenta con temperaturas máximas altas durante el invierno, zondas y ausencia de nieve (Gonzalez Antivilo et al. 2017 y Capítulo 2). Por lo tanto, nunca se consideró que el frío pudiera causar muerte en viñedos en Mendoza. A esto se le suma el hecho de que los síntomas descriptos no se observan todos los años y en todos los oasis.

De acuerdo con las temperaturas de daños en floemas obtenidas en el capítulo 3 de esta tesis se elaboró una escala de temperaturas probables de daños según los meses del año (-10 °C para julio, -8 °C para agosto y -6 °C para septiembre) aunque se sabe que son muchos los factores que podrían intervenir en la resistencia de las plantas. Al comparar las temperaturas postuladas de probables daños con las temperaturas mínimas absolutas de la Tabla 4.3 (provenientes de casillas meteorológicas, DAAC) se puede apreciar que en

Mendoza es posible, dependiendo del año, registrar daños en floema de las vides. De hecho, estos daños se han registrado empíricamente en diferentes regiones de la provincia con muerte de floema en distinto grado (Figura 4.1). La situación puede ser más grave aún si consideramos que las temperaturas registradas en las casilla meteorológicas generalmente sobrestiman las temperaturas mínimas ocurridas a nivel de planta (Gonzalez Antivilo et al. 2017, Capítulo 2). Haciendo esta extrapolación, aunque sea aproximada, se observa que las temperaturas del invierno en la provincia de Mendoza pueden considerarse extremas en algunos años y oasis. Por otra parte, cada cultivar de vid tiene una resistencia máxima al frío que depende de las temperaturas previas en el año, pero que también la tasa de desaclimatación durante la parte final del invierno es diferencial (Londo y Kovaleski 2017, Capítulo 3 de esta tesis). Si a esto le agregamos el hecho de que en un estudio de entre más de 20 variedades de uva, Malbec y Merlot fueron las menos resistentes tanto en yemas como en floema de las sarmientos (Strik 1992), se justifica la situación que se registra empíricamente.

A su vez, se puede ver claramente en la tabla 4.4 que existe una probabilidad de daños diferencial por oasis, por lo menos con las temperaturas de los últimos 10 años. Así el oasis Este y el Centro tienen las mayores probabilidad de daño, seguidos por el oasis Norte. Mientras que queda casi exceptuado de posibles daños el oasis Sur, por lo menos según los datos utilizados para el análisis.

Es llamativo que los distintos términos que hacen referencia a la problemática de brotaciones desaparejas al inicio del ciclo tengan una distribución marcada entre los diferentes países. Así, el término RSG no se ha acuñado en países como EEUU, donde si reconocen los síntomas de daño por eriofidos como SSS y los daños por frío como Frost injury. Sin embargo en el Hemisferio Sur se utilizó el término RSG pero inespecíficamente ya que incluye daños por frío, daños por eriófidos e incluso desbalances fisiológicos.

Parte de esta confusión puede deberse a las características climáticas particulares de cada región. De este modo, el clima continental característico de algunas regiones vitícolas como los estados de Oregon, Colorado, Washington en EEUU y Mendoza y San Juan en Argentina. En estas zonas templadas con temperaturas extremas durante el invierno los daños pueden ocurrir en cualquier momento de la ED.

Contrariamente, en climas templado-marítimos característicos de otros países vitícolas como Australia, Sudafrica, Japón, Corea del Sur, Nueva Zelanda, se caracterizan por la ausencia de temperaturas extremas en el invierno-intermedio e invierno-tardío (Fuller et al. 2009). Así, son países donde ocasionalmente pueden registrar daños por frío, y donde la descripción de la sintomatología puede generar confusión entre diversos agentes bióticos y abióticos.

En la actualidad, se le llama daño por frío (Frost injury) a los que ocurren en cualquier momento del año. Cuando estos daños ocurren durante la etapa de crecimiento, estos son claramente distinguibles y afectan la producción del año y son los que mas desvelan a los productores vitícolas de MZA debido a las consecuencias económicas directas e inmediatas que conllevan. Contrariamente, los daños que ocurren durante la estación de dormición permanecen “ocultos” en la madera hasta que se re-inicia el ciclo, es decir que pueden pasar varios meses entre el daño y la visualización de los síntomas. Estos afectan, además de la producción del año, la sustentabilidad del viñedo. En MZA no existe un seguimiento eficiente de las condiciones ambientales con un rango de resolución temporal y espacial adecuado y por otra parte hay un desconocimiento absoluto de la resistencia al frío puntual de las plantas durante toda la estación de dormición. Es por ello que se dificulta el correcto diagnóstico de los síntomas.

Hoy en día no hay una clara definición de los daños por frío según la época de ocurrencia y

según el tejido afectado. Es por ello que propongo que se denomine al síndrome que es producido por daños en floema debido a heladas durante la estación de dormición como “Daños Ocultos de la Dormición” o simplemente DOD. La sintomatología que lo define se debe a: brotaciones retrasadas, heterogéneas, débiles, y yemas ciegas en casos leves o moderados, y en casos más severos, muerte parcial o de la estructura permanente (brazos o troncos) con brotaciones desde el cuello de la planta, cuyo agente causal es la muerte parcial o total del anillo floemático.

4.5. Conclusiones

Los daños en el floema de la vid determinan brotaciones atrasadas, con yemas “ciegas” lo que al final del ciclo se traduce como una pérdida de vigor de la planta y a su vez menor calidad y cantidad de racimos.

La vid es sumamente vulnerable a este tipo de daños durante la época invernal ya que durante la estación de dormición posee solo una única capa de floema que es reactivado al comenzar el ciclo vegetativo, pero la formación de nuevo tejido floemático comienza luego de la brotación. El daño en este tejido vascular determinan un desabastecimiento energético en un momento demandante del ciclo vegetativo por intensa actividad meristemática y formación de nuevos tejidos.

Al conjunto de síntomas que se desprenden del daño en este tejido conducto se propone la denominación DOD.

4.6. Anexo

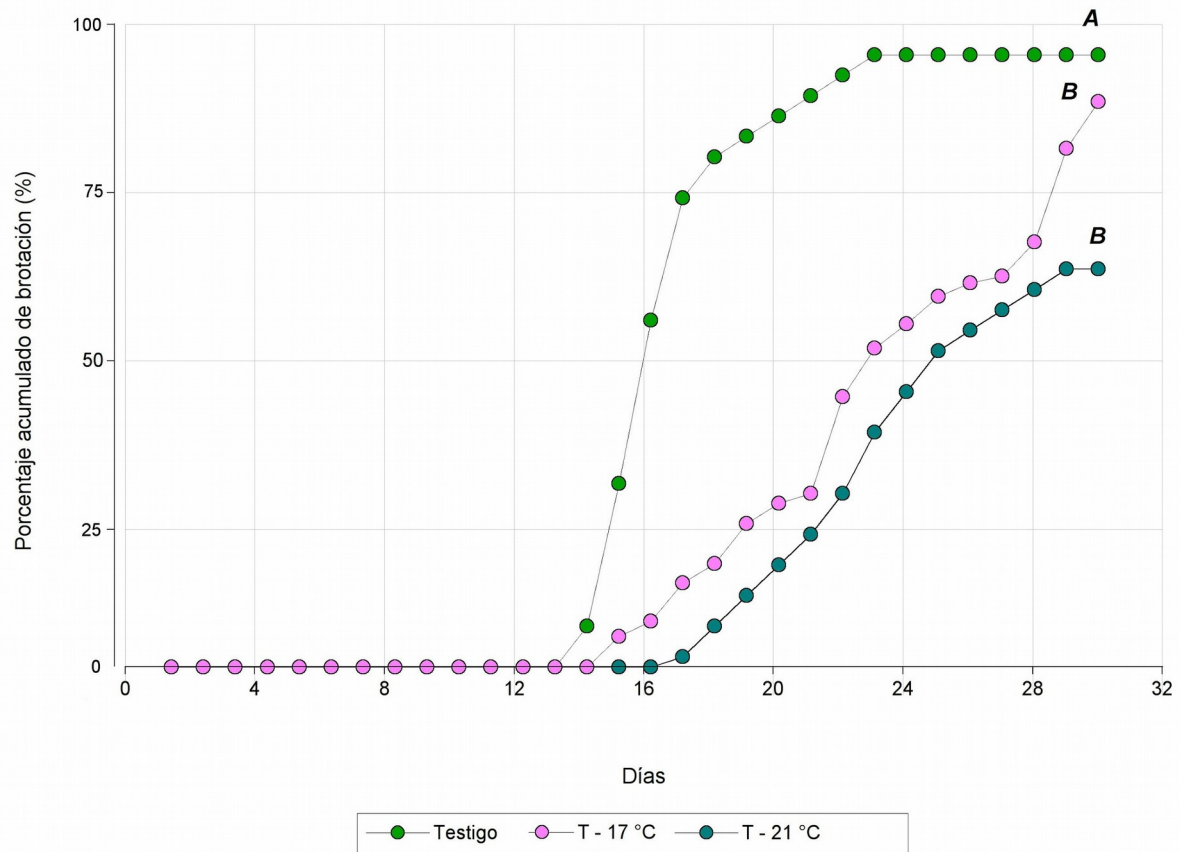
4.6.1. Anexo 1: Evolución de la brotación en estacas uninodales de *Vitis vinifera* var. Merlot sometidas a heladas de distinta severidad. Experimento realizado en IAREC, WA, EEUU

En esta caso el material vegetal de Merlot fue obtenido de igual manera que lo descrito en la figura 3.5a. Tal como se realizó en el apartado 4.2.1. de materiales y métodos.

La figura 4.13 presentada abajo no cuenta con un tratamiento de helada subletal como en el experimento 1 sino que presenta una con daño parcial (T -17) y otra con daño severo (T -21). Al comparar con el experimento 1 es evidente que las temperaturas de los tratamientos son notablemente diferentes en parte porque es otra variedad pero también es otra zona. A diferencia del experimento 1, en el experimento 2 la brotación fue mucho más retrasada incluso en el testigo ya que comenzó recién al día 14 de comenzado el ensayo. Sin embargo para el testigo la brotación fue muy compacta alcanzando el máximo de brotación en menos de una semana.

La brotación de los tratamientos T -17 y T -21 se atrasó entre un par de días y una semana pero la evolución fue más lenta, llegando al máximo de brotación cerca de 1 semana después que el testigo. Se ve claramente, al igual que experimento 1, que el tratamiento con helada más severa no alcanza el 100 % brotación, por lo que sufrió daños irreversibles en la madera. En este caso el testigo se comportó distinto a los otros dos tratamientos, lo que permite concluir que los daños en madera sean leves o graves generan un retraso más o menos marcados en la brotación.

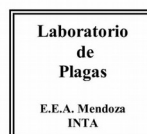
Figura 4.13. Evolución de la brotación en estacas uninodales de *Vitis vinifera* var. Merlot sometidas a diferente severidad de heladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\Delta = 0,05$).



4.6.2. Anexo 2: Conteo de eriófidos en yemas no brotadas de vid



Estación Experimental Agropecuaria Mendoza
Centro de Estudios de Fitofarmacia



San Martín 3853 - CC 3 - (5507) Luján de Cuyo - Mendoza - Tel.: 54-261-4963020/332 Fax: 54-261-4963320
e-mail: mherrera@mendoza.inta.gov.ar - fitofarmacia@mendoza.inta.gov.ar

LABORATORIO DE PLAGAS

Pág. 1 de 1

ANÁLISIS DE PRESENCIA DE PLAGAS

Nº: 222

Cliente: Francisco Gonzalez Antivilo.

Dirección: El Peral, Tupungato

Procedencia de la muestra: El Peral, Tupungato.

Fecha de ingreso: 01/11/2016.

Fecha de análisis: 03/11/2016.

Fecha de elaboración de informe: 03/11/2016.

Material: yemas de vid var. Malbec.

Cantidad: 3 unidades.

Responsable del muestreo: Francisco Gonzalez Antivilo.

Identificación de la muestra: **Muestra N°1 al N°10**

Determinación solicitada: Análisis de Eriófidos de yemas no brotadas de vid var. Malbec

Técnica de Extracción: **Procedimiento Operativo desarrollado por el laboratorio**

Resultados:

Cantidad de ejemplares de *Eriophyes vitis* en 3 yemas de vid.

Numero de muestra	Resultado
Nº 1	No se encontraron ejemplares
Nº 2	No se encontraron ejemplares
Nº 3	No se encontraron ejemplares
Nº 4	No se encontraron ejemplares
Nº 5	No se encontraron ejemplares
Nº 6	No se encontraron ejemplares
Nº 7	No se encontraron ejemplares
Nº 8	No se encontraron ejemplares
Nº 9	No se encontraron ejemplares
Nº 10	No se encontraron ejemplares

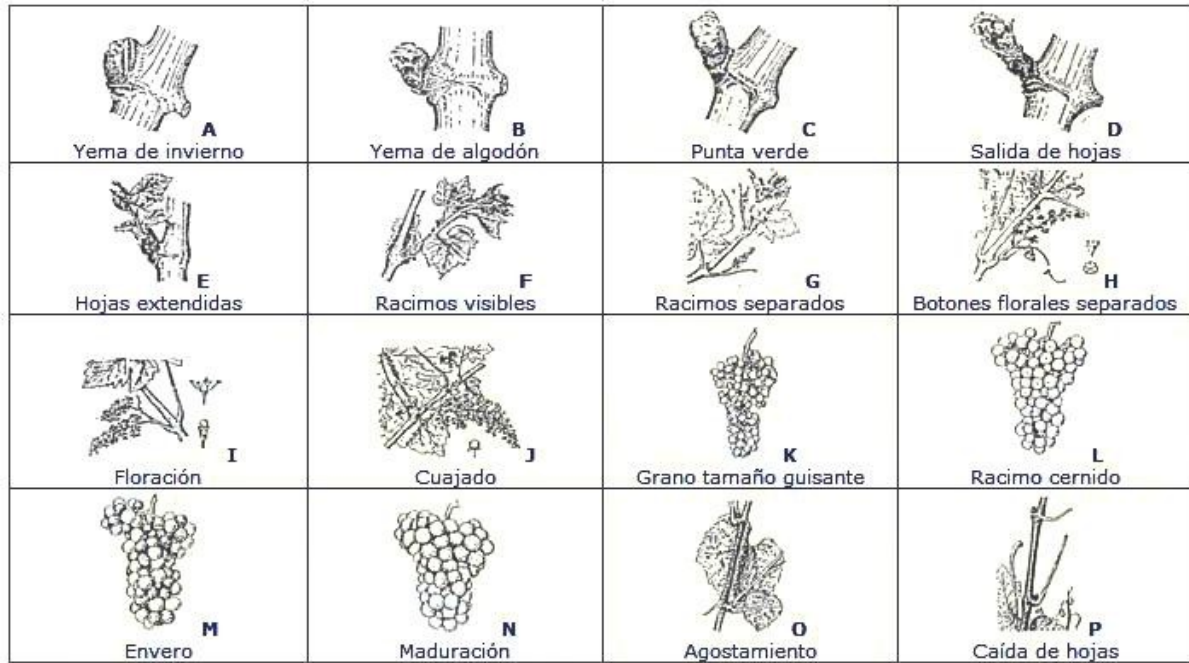
Analizó: María Eugenia Herrera

Ing. Agr. María Eugenia Herrera
Protección Vegetal
Sector Fitofarmacia y
Manejo Integrado de Plagas

Este informe no podrá ser reproducido parcialmente sin la autorización escrita del Laboratorio. Los resultados obtenidos se refieren exclusivamente a la muestra presentada. El Laboratorio de Plagas no se hace responsable de la toma de muestra, ni de su transporte, ni conservación fuera de la EEA Mendoza; como así tampoco del uso indebido o incorrecto que se hiciere de este informe. Las muestras serán conservadas durante 3 (tres) días posteriores a la fecha del presente informe.

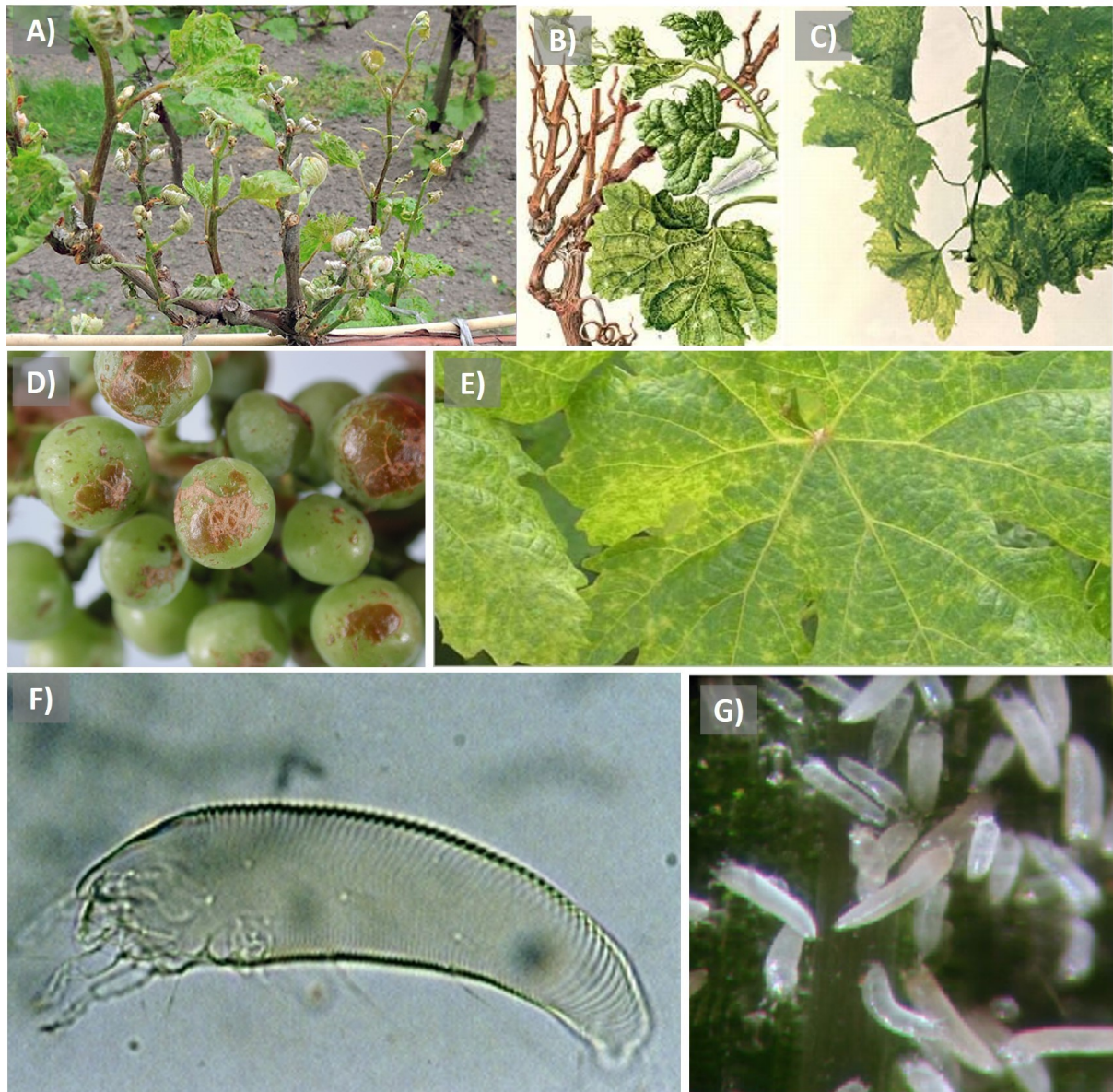
4.6.3. Anexo 3

Figura 4.14. Estados fenológicos de la vid según Baggiolini (1952)



4.6.4. Anexo 4

Figura 4.15. Síntomas causados por eriofidos en *Vitis vinifera*. A) Deformaciones en brotes. B y C) Hojas deformadas con agallas protuberantes. D) Russeting en bayas de vid. E) Clorosis y russeting en hojas. F) Eriófidos visto en microscopio G) Eriófidos visto en lupa.



Conclusiones finales

1. En esta tesis se ha demostrado que las condiciones de alta amplitud térmica diaria de la provincia de Mendoza, debido a un alto índice de continentalidad y la ocurrencia de vientos Zonda, favorece la pérdida de resistencia al frío de las estructuras permanentes de la vid durante la estación de dormición.
2. Las temperaturas de resistencia de los tejidos conductores como xilema y floema, informados en esta tesis son menores a los que se describen en la mayoría de la bibliografía referenciada. Esto podría deberse a lo mencionado anteriormente.
3. Sin embargo, en una misma zona y un mismo clon, el parámetro térmico dominante y que guía el estado de resistencia al frío de troncos de vid a través de la estación de dormición es la temperatura mínima. Esto es especialmente válido para el tejido floemático del tronco.
4. A su vez, se demuestra la que los ambientes con temperaturas mínimas más altas generan condiciones de menor resistencia al frío en troncos de vid, lo que se traduce como una mayor vulnerabilidad ante eventos de heladas.
5. Según lo reportado en esta tesis, el ambiente térmico al cual están sometidas las plantas de vid tiene efecto sobre la resistencia al frío en floema solo hasta 1 mes previo a la brotación, ya que a partir de allí comienza un proceso de desaclimatación más acusado.
6. Los azúcares solubles tienen una importancia relativa más alta como compuesto crioprotector seguido por el contenido de agua y los aminoácidos totales.

7. Sarmientos de Malbec sometidas a diferentes intensidades de heladas mostraron daños anatómicos en el tejido floemático. La severidad del daño es gradual y se relaciona con los umbrales de resistencia al frío de la sarmiento, afectando progresivamente el momento de brotación y la evolución del estadio fenológico. Los daños comienzan en floema pero a medida que la intensidad de la helada es mas severa, puede afectar además el cambium.

8. Por otra parte, también se logró determinar que el comienzo de actividad del cambium del año es posterior a la brotación, por lo que si el floema es dañado durante la estación de dormición, las yemas pierden la vascularización con el floema, restringiéndose así el abastecimiento energético lo que conlleva a consecuencias sobre la brotación y el crecimiento.

9. Además los daños en floema de troncos traen consecuencias en el vigor de la planta y en la cantidad de uva y la calidad de la misma. Así, los brotes de plantas afectadas por heladas invernales con daño en floema son más cortos, débiles, con menos racimos, pero además con menos granos por racimo y más ácidos que los brotes de las plantas sin daño. Por otro lado se genera un desbalance vegetativo/reproductivo con consecuencias para la resistencia al frío de la planta de la próxima estación de dormición y poda.

10. En base a los registros históricos de temperatura en los diferentes oasis productivos de Mendoza, y en función de los resultados obtenidos en esta tesis de los valores de resistencia al frío, es claro que durante la estación de dormición hay ocurrencia de temperaturas potencialmente dañinas para el floema de los troncos o las sarmientos de vid. En base a esto, se determinó un mayor riesgo de daño por heladas en los oasis Este y Centro, aunque en

menor medida también existen riesgos potenciales en oasis Norte y Sur.

11. También quedó demostrado en esta tesis que las temperaturas en la zona del cuello de la planta son más cálidas de día y más frías durante la noche, que lo registrado por la casilla meteorológica. Por lo cual se plantea la necesidad de mediciones “in situ” con alta resolución espacial para determinar la potencialidad de daño de las heladas, y no subestimarlos.

12. Los escenarios térmicos planteados en esta tesis podrían corresponderse con las predicciones de cambio climático del aumento de las temperaturas, lo cual demuestra que a mayor temperaturas mínima durante el invierno, mayor es la susceptibilidad de la planta a las heladas.

13. La conclusión final de esta tesis es que los síntomas que se han observados en la provincia de Mendoza caracterizados por una brotación atrasada y heterogénea con brotes cortos (pasmados en lenguaje vitícola), con una distribución espacial aleatoria, se deben a daños en floema por heladas durante la estación de dormición. Para este síndrome y su agente causal proponemos el nombre DOD o Daños Ocultos de la Dormición. También podrían confundirse con desbalances fisiológicos de las plantas pero en tal caso no presentaría daños anatómicos. Otra causa citada para síntomas parecidos son los eriofidos sin embargo, no son una plaga de importancia en la provincia de Mendoza y no se han encontrado en yemas no brotadas.

Referencias bibliográficas

- Ahmedullah M (1985) An analysis of winter injury to grapevines as a result of two severe winters in Washington. *Fruit Var. J.* 39;29-34.
- Ait Barka E, Audran JC (1997) Response of champenoise grapevine to low temperatures: changes of shoot and bud proline concentrations in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. *Journal of Horticultural Science*, 72(4), 577-582.
- Ancapichun S, Garcés-Vargas J (2015) Variability of the Southeast Pacific Subtropical Anticyclone and its impact on sea surface temperature off north-central Chile. *Ciencias Mar* 41:1–20. doi:10.7773/cm.v41i1.2338
- Andrews PK, Sandidge CR, Toyama TK (1984) Deep supercooling of dormant and deacclimating *Vitis* buds. *Am J Enol Vitic* 35:175–177
- Arias NS, Bucci SJ, Scholz FG, Goldstein G (2015) Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, cell & environment*, 38(10), 2061-2070.
- Aslamarz AA, Vahdati K, Rahemi M, Hassani D, Leslie C (2010) Supercooling and cold-hardiness of acclimated and deacclimated buds and stems of Persian walnut cultivars and selections. *HortScience*, 45(11), 1662-1667.
- AWRI (2010) Understanding grapevine growth. Restrictec Spring Growth syndrome (RSG). <https://www.awri.com.au/>
- Badulescu R, Ernst M (2006) Changes of temperature exotherms and soluble sugars in grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds during winter. *Journal of applied botany and food quality*, 80(2), 165-170.
- Baggiolini M (1952) Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture* 8(1), 4–6.

- Battany M, Smith R, Tindula G, Snyder R (2012) Measuring springtime temperature inversion conditions for estimating the potential of wind machines for frost protection. *Amer Soc Enology Viticulture* 63(3): 456A–456A
- Beck EH, Heim R, Hansen J (2004) Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of biosciences*, 29(4), 449-459.
- Berli FJ, Alonso R, Bressan-Smith R, Bottini R (2013) UV-B impairs growth and gas exchange in grapevines grown in high altitude. *Physiologia plantarum*, 149(1), 127-140.
- Bernard MB, Horne PA & Hoffmann AA (2005) Eriophyoid mite damage in *Vitis vinifera* (grapevine) in Australia: *Calepitrimerus vitis* and *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) as the common cause of the widespread ‘Restricted Spring Growth’ syndrome. *Experimental & applied acarology*, 35(1-2), 83-109.
- Bernstein L, Bosch P, Canziani O, Chen Z, Christ R, Riahi K (2008)
- Bianchi AR, Yáñez CE (1992) Las Precipitaciones en el Noroeste Argentino, 2nd edn. INTA EEA, Salta
- Blennow K (1998) Modelling minimum air temperature in partially and clear felled forests. *Agric For Meteorol* 91(3):223–235
- Brown GN, Bixby JA (1976) Relationship between black locust seedling age and induction of cold hardiness. *Forest Science* 22: 208-210.
- Brusky Odneal M (1983) Winter bud injury of grapevines 1981–1982. *Fruit Varieties J* 37(2):45–51
- Burgos J (2010) Las heladas en la Argentina. Minagri, 2nd edn. Ed. Orientación Gráfica, Buenos Aires

- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH (1976) Freezing and injury in Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 27:507-528
- Burrows A (1940) The Chinook wind. Or Hist Q 41(1):103–106
- Candolfi-Vasconcelos MC, Candolfi MP, Kohlet W (1994) Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. Planta, 192(4), 567-573.
- Cannell MGR, Smith RI (1986) Climatic warming, spring budburst and frost damage on trees. Journal of Applied Ecology 23:177-191.
- Canziani, Pablo; Scarel, Eduardo. "South American Viticulture, Wine Production, and Climate Change" (PDF). Pontificia Universidad Católica Argentina. Retrieved 18 June 2015.
- Caretta A, Ortega A, Ortiz Maldonado A (2004) Probability of damage to vines, fruit and olive trees blossom by Zonda wind Mendoza, Argentina. Rev FCA UNCuyo 36:49–58
- Cavagnaro M, Canziani P, Portela J, Robledo W (2014) Evolución de tres índices bioclimáticos para la vid en San Martín y Luján de Cuyo (Mendoza, Argentina). In 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2) (p. 05007). EDP Sciences. doi: 10.1051/oivconf/201405007
- Cavagnaro, B (2003) Brotación deficiente de viñedos jóvenes en primavera. Nota periodística, Diario Los Andes, 17 de noviembre.
- Charrier G, Ameglio T (2011) The timing of leaf fall affects cold acclimation by interactions with air temperature through water and carbohydrate contents. Environ Exp Bot 72:351–357. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.12.019
- Charrier G, Ngao J, Saudreau M, Améglio T (2015) Effects of environmental factors and management practices on microclimate, winter physiology, and frost resistance in trees. Front Plant Sci 6:1–18. doi: 10.3389/fpls.2015.00259 Int J Biometeorol

- Che T, Burke M, Gusta L (1995) Freezing tolerance in plants. In: Biological Ice Nucleations and Its Applications. R.E. Lee, R; Warren, C; Gusta, L, eds. Pp. 115-136. APS Press, St. Paul.
- Chen PM, Li PH (1977). Induction of frost hardiness in stem cortical tissues of *Cornus stolonifera* Michx. by water stress. II. Biochemical changes. *Plant Physiology* 59: 240-243. doi: [10.1104/pp.59.2.240](https://doi.org/10.1104/pp.59.2.240)
- Cho MR, Lee JH, Jeon SW, Kang TJ, Kim HH, Yang CY & Ahn SJ (2013) Occurrence and distribution of the grape rust mite *Calepitrimerus vitis* (Nalepa, 1905) in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(4), 415-419.
- Climatic-data (2017) <https://es.climate-data.org/>
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 100 (2), 291-296.
- Constable FE, Jones J, Gibb KS, Chalmers YM & Symons RH (2004). The incidence, distribution and expression of Australian grapevine yellows, restricted growth and late season leaf curl diseases in selected Australian vineyards. *Annals of applied Biology* 144(2), 205-218.
- Core Team R (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna <http://www.R-project.org/>
- Cragin J, Serpe M, Keller M, Shellie K (2017) Dormancy and cold hardiness transitions in wine grape cultivars chardonnay and cabernet sauvignon. *Am J Enol Vitic.* doi:10.5344/ajev.2016.16078
- Currle O, Bauer O, Hofäcker W, Schumann F, Frisch W (1983) Biology of grapevines. Meiningen.
- Dambrorská M (1978) The effect of higher winter temperatures on changes of the frost resistance of grapevine buds. *Vitis* 17:341–349

- Davenport JR, Keller M, Mills LJ (2008) How cold can you go? Frost and winter protection for grape. *HortScience*, 43(7), 1966-1969.
- Deis L, de Rosas M, Malovini E, Cavagnaro M, Cavagnaro JB (2015) Impacto del cambio climático en Mendoza: Variación climática en los últimos 50 años. Mirada desde la fisiología de la vid. *Rev FCA UNCuyo* 47:67-92.
- Delpierre N, Vitasse Y, Chuine I, Guillemot J, Bazot S & Rutishauser T (2015) Temperate and boreal forest tree phenology: from organ-scale processes to terrestrial ecosystem models. *Ann. For. Sci.* 73:5–25. [10.1007/s13595-015-0477-6](https://doi.org/10.1007/s13595-015-0477-6)
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo, CW (2017). InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo JA, Guzman AW, Casanoves F (2002) A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 7:129–142. doi:10.1198/10857110260141193
- Dirección de contingencias climáticas de la provincia de Mendoza (DACC). <http://www.contingencias.mendoza.gov.ar/>
- Druart N, Johansson A, Baba K, Schrader J, Sjödin A, Bhalerao RR, Resman L, Trygg J, Moritz T, Bhalerao RP (2007) Environmental and hormonal regulation of the activity–dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *The Plant Journal*, 50: 557–573. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03077.x
- Duncan DR, Widholm JM (1987) Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiology*, 83(3), 703-708.

- Duncan, D. R., & Widholm, J. M. (1991) Proline is not the primary determinant of chilling tolerance induced by mannitol or abscisic acid in regenerable maize callus cultures. *Plant physiology*, 95(4), 1284-1287.
- Eagles CF (1989) Temperature-induced changes in cold tolerance of *Lolium perenne*. *J Agric Sci* 113:339–347. doi:10.1017/S0021859600070027
- Easterling D, Meehl G, Parmesan C, Changnon S, Karl T, Mearns L (2000) Climate extremes: observations, modeling and impacts. *Science* 289(5487):2068–2074. doi:10.1126/science.289.5487.2068
- Echarte M, Angeloni P, Jaimes F, Tognetti J, Izquierdo N, Valentinuz O, Aguirrezába L (2010) Night temperature and intercepted solar radiation additively contribute to oleic acid percentage in sunflower oil. *Field Crops Res* 119(1):27–35. doi:10.1016/j.fcr.2010.06.011
- Esau K (1965) Anatomy and cytology of *Vitis* phloem. *California Agriculture*, 37(2), 17-72.
- Fall S, Watts A, Nielsen-Gammon J, Jones E, Niyogi D, Christy J, Pielke R (2011) Analysis of the impacts of station exposure on the U.S. Historical Climatology Network temperatures and temperature trends. *J Geophys Res* 116:D14120. doi:10.1029/2010JD015146
- Farrell J (2010) Deacclimation response to winter temperature fluctuations in *Lolium perenne*. Graduate Theses and Dissertations. Paper 11831. Iowa State University
- Fennell A (2004) Freezing tolerance and injury in grapevines. *J Crop Improv* 10(1–2):201–235. doi:10.1300/J411v10n01
- Fennell A, Hoover E (1991) Photoperiod influences growth, bud dormancy, and cold acclimation in *Vitis labruscana* and *V. riparia*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(2), 270-273.

- Ferguson J, Tarara J, Mills L, Grove G, Keller M (2011) Dynamic thermal time model of cold hardiness for dormant grapevine buds. *Ann Bot Lond* 107(3):389–396. doi:10.1093/aob/mcq263
- Ferguson JC, Moyer MM, Mills LJ, Hoogenboom G, Keller M (2013) Modeling dormant bud cold hardiness and budbreak in 23 *Vitis* genotypes reveals variation by region of origin. *American Journal of Enology and Viticulture*, ajev-2013.
- Friend AP, Trought MCT, Stushnoff C, Wells GH (2011) Effect of delaying budburst on shoot development and yield of *Vitis vinifera* L. Chardonnay ‘Mendoza’ after a spring freeze event. *Aust J Grape Wine Res* 17:378–382. doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00162.x
- Fuchigami LH, Weiser CJ, Kobayashi KD, Timmis R, Gusta V (1982) A degree growth stage (GS) model and cold acclimation in temperate woody plants. In: Li PH, Sakai A (eds) *Plant cold hardiness and freezing stress. II Plant acclimation*. Academic Press, New York, pp 93–116
- Fuller MP, Telli G (1999) An investigation of the frost hardiness of grapevine (*Vitis vinifera*) during bud break. *Annals of applied biology*, 135(3), 589-595.
- Gedalof ZE, Peterson DL, Mantua NJ (2005) Atmospheric, climatic, and ecological controls on extreme wildfire years in the northwestern United States. *Ecol Appl* 15(1):154–174
- Giantomasi M, Roig Junent F, Villagra P, Srur A (2009) Annual variation and influence of climate on the ring width and wood hydrosystem of *Prosopis flexuosa* DC trees using image analysis. *Trees* 23(1):117–126. doi:10.1007/s00468-008-0260-5
- Glerum C (1985) *Frost hardiness of coniferous seedlings: principles and applications*.
- Goffinet MC (2004). *Anatomy of grapevine winter injury and recovery*. Departmental Research Paper, Department of Horticultural Services, Cornell University, Geneva.

- Goffinet MC (2007) Grapevine cold injury and recovery after tissue damage and using cane burial to avoid winter injury. Understanding and preventing freeze damage in vineyards – Workshop proceedings. University of Missouri – Columbia.
- Gonzalez Antivilo F, Paz RC, Keller M, Borgo R, Tognetti J, & Roig Juñent F (2017) Macro- and microclimate conditions may alter grapevine deacclimation: variation in thermal amplitude in two contrasting wine regions from North and South America. International Journal of Biometeorology, 1-13.
- González G, Nazralla J, Beltrán M, ..., Alberto M (2009) Caracterización de uvas para vinificar en diferentes regiones de Mendoza (Argentina). Rev FCA UNCuyo 41(1):165-175.
- Greenham CG (1966) The stages at which frost injury occurs in alfalfa. Can. J. Bot. 44: 1471-1483.
- Gu L, Hanson P, Mac Post W, Kaiser D, Yang B, Nemani R, Meyers T (2008) The 2007 eastern US spring freeze: increased cold damage in a warming world. Bioscience 58(3):253–262
- Gu S, Ding P, Howard S (2002) Effect of temperature and exposure time on cold hardiness of primary buds during the dormant season in ‘Concord’, ‘Norton’, ‘Vignoles’ and ‘St. Vincent’ grapevines. J Hortic Sci Biotechnol 77:635–639
- Gusta L, Wisniewski M (2013) Understanding plant cold hardiness: an opinion. Physiol Plant 147:4–14. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01611.x
- Guy CL (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 187-223. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.001155.
- Hamman RA, Dami IE, Walsh TM, Stushnoff C (1996) Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of Chardonnay and Riesling grapevines. Am J Enol Vitic 47:31–36

- Hänninen H (1991) Does climatic warming increase the risk of frost damage in northern trees? *Plant Cell Environ.* 14:449-454.
- Harrison LC, Weiser CJ, Burke MJ (1978) Environmental and seasonal factors affecting the frost-induced stage of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. *Plant Physiology* 62: 894-898.
- Haynes CL, Lindstrom OM, Dirr MA (1992) Cooling and warming effects on cold hardiness estimations of three woody ornamental taxa. *Hortscience* 27(12):1308–1309
- Heber U (1968) Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing. *Cryobiology* 5: 188-201
- Hinesley LE, Pharr DM, Snelling LK, Funderburk, SR (1992) Foliar raffinose and sucrose in four conifer species: relationship to seasonal temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(5), 852-855.
- Holubowicz T (1978) Survival test as a method of frost injury estimation. *Acta Horticulturae* 81: 119-122.
- Howell GS (2000) Grapevine Cold Hardiness: mechanisms of cold acclimation, mid-winter hardiness maintenance, and spring deacclimation. In *Proceedings of the American Society of Enology and Viticulture Annual Meeting*, Seattle, Washington, June (Vol. 19, p. 23).
- Howell GS, Shaulis N (1980) Factors influencing within-vine variation in the cold resistance of cane and primary bud tissues. *Am J Enol Vitic* 31(2):158–161
- Howell GS, Weiser CJ (1970) The environmental control of cold acclimation in apple. *Plant Physiology* 45: 390-394.
- Hubackova M (1996) Dependence of grapevine bud cold hardiness on fluctuations in winter temperatures. *Am J Enol Vitic* 47:100–102

- Huglin P (1978) Comptes Rendus de l'Academie de l'Agriculture de France 64:1117–1126.
- INDEC (2010) Censo Nacional de Población, Hogares y Viviencias. Obtenido de <https://www.indec.gob.ar/>
- INV. Instituto Nacional de Vitivinicultura www.inv.gob.ar
- IPCC, 2007: climate change 2007: synthesis report. Geneva: IPCC. ISBN 2-9169-122-4
- Irving RM, Lanphear FO (1967) Environmental control of cold hardiness in woody plants. Plant Physiology 42: 1191-1196
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Hakke V, Zhnag JZ, Deits T, Thomashow MF (2001) Components of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor Cold-Response Pathway Are Conserved in *Brassica napus* and Other Plant Species Plant Physiology, 127, 910–917.
- Jiang H, Howell GS (2002) Correlation and regression analyses of cold hardiness, air temperatures, and water content of Concord grapevines. Am J Enol Vitic 53:227–230
- Jones G, Davis R (2002) Climate Influences on Grapevine Phenology, Grape Composition, and Wine Production and Quality for Bordeaux, France. Am J Enol Vitic 51:249-261.
- Jones KS, Paroschy J, McKersie BD Bowley SR (1999) Carbohydrate composition and freezing tolerance of canes and buds in *Vitis vinifera*. J. Plant Physiol. 155:101-106.
- Jordan D, Smith W (1995) Microclimate factors influencing the frequency and duration of growth season frost for subalpine plants. Agric For Meteorol 77(1):17–30
- Kadir SA, Proebsting EL (1994) Various freezing strategies of flower-bud hardiness in Prunus. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 119(3):584-588.
- Kaiser M, Bergamin D, Sola C (2003) Brotación deficiente de primavera o Restricted Spring Growth. Documento técnico de divulgación Vivero Mercier.

- Kaku, S., M. Iwaya, and M. Kunishige. Supercooling ability of Rhododendron flower buds in relation to cooling rate and cold hardiness. *Plant and Cell Physiol.* 21:1205-16 (1980).
- Kalberera S, Wisniewski M, Arora R (2006) Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Sci* 171(1):3–16. doi:10.1016/j.plantsci.2006.02.013
- Kang SK, Motosugi H, Yonemori K, Sugiura A (1998) Exothermic characteristics of dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) in relation to cold hardiness. *HortScience*, 32(5), 840-843.
- Kang SK, Motosugi H, Yonemori K, Sugiura A (1998) Supercooling characteristics of some deciduous fruit trees as related to water movement within the bud. *J. Hort. Sci. and Biotechnology* 73:165-172.
- Keller M (2010) *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. Elsevier: Academic Press, Burlington, MA, USA.
- Keller M, Mills LJ (2007) Effect of pruning on recovery and productivity of cold-injured merlot grapevines. *Am J Enol Vitic* 58(3):351–357
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell L (1987) Endo, para and Ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22(3):371-376.
- Lee SK, Im JS, Jung JK, Kim DH & Lee JH (2015). Flower and leaf damage of grapevines caused by the grape rust mite, *Calepitrimerus vitis* (Nalepa). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(1), 51-54.
- Leuning R, Cremer KW (1988) Leaf temperatures during radiation frost part I. Observations. *Agric For Meteorol* 42(2–3):121–133

- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd ed. New York, Academic Press. 497 p.
- Lindén L (2002) Measuring cold hardiness in woody plants. Tesis
- Londo JP, Kovalski AP (2017) Characterization of Wild North American Grapevine Cold Hardiness Using Differential Thermal Analysis. American Journal of Enology and Viticulture, ajev-2016. doi: [10.5344/ajev.2016.16090](https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16090)
- Mass C, Dotson B (2010) Major extratropical cyclones of the Northwest United States: historical review, climatology, and synoptic environment. Mon Weather Rev 138(7):2499–2527. doi:10.1175/2010MWR3213.1
- McCready RM, Guggolz J, Silviera V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical chemistry 22(9): 1156-1158.
- McNamara S, Pellett H (1998) Cold hardiness of weigela cultivars. Journal of Environmental Horticulture 16: 238-242.
- Meehl GA (2000) An introduction to trends in extreme weather and climate events: Observations, socioeconomic impacts, terrestrial ecological impacts, and model projections. Bulletin of the American Meteorological Society. 81: 413 - 416.
- Menne M, Williams C, Palecki M (2010) On the reliability of the U.S. surface temperature record. J Geophys Res 115:D11108. doi:10.1029/2009JD013094
- Mills LJ, Ferguson JC, Keller M (2006) Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. Am J Enol Vitic 57:194–200
- Moran RE, Sun Y, Geng F, Zhang D, Fazio G (2011) Cold temperature tolerance of trunk and root tissues in one-or two-year-old apple rootstocks. HortScience, 46(11): 1460-1464.

- Mosedale JR, Wilson RJ, Maclean IM (2015) Climate change and crop exposure to adverse weather: changes to frost risk and grapevine flowering conditions. PloS one, 10(10), e0141218.
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992) Biology of the grapevine. Cambridge University Press, Cambridge
- Nelson D, Cox M (2005). Lehninger. Principios de la bioquímica. Edit. Omega S.A. 4ta ed.
- Norte F, Simonelli S (2016) Validation of a statistical forecast model for Zonda wind in West Argentina based on the vertical atmospheric structure. Atmos Clim Sci 6(1):35–50
- Okamoto G, Shippin W, Ken H (2000) Cold resistance in root and cane of own-root 'Kyoho' grapevines. Sci Rep Fac Agric Okayama Univ 89:23–29
- Oliveira CM, Priestley CA (1988) Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees. Horticultural Reviews, Volume 10, 403-430.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) <http://www.oiv.int/es/>
- Pagter M, Arora R (2013) Winter survival and deacclimation of perennials under warming climate: physiological perspectives. Physiol Plant 147:75–87. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01650.x
- Pagter M, Williams M (2011) Frost dehardening and rehardening of Hydrangea macrophylla stems and buds. Hortscience 46(8):1121–1126
- Paroschy JH, Meiering AG, Peterson RL, Hostetter G, Neff A (1980) Mechanical winter injury in grapevine trunks. Am J Enol Vitic 31(3):227–232
- Pierquet P, Stushnoff C (1980) Relationship of low temperature exotherms to cold injury in *Vitis riparia* Michx. American Journal of Enology and Viticulture, 31(1), 1-6.
- Pierquet P, Stushnoff C, Low Burke MJ (1977) Temperature exotherms in stem and bud tissues of Michx. J Am Chem Soc Hortic Sci 102:54–55

- Poirier M, Lacoïnte A, Améglio T (2010) A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiol.* 30:1555-1569.
- Prislan P, Èufar K, Koch G, Schmitt U, Griçar J. (2013) Review of cellular and subcellular changes in the cambium. *IAWA J.* 34:391–407. [10.1163/22941932-00000032](https://doi.org/10.1163/22941932-00000032)
- Proebsting EL, Ahmedullah M, Brummund VP (1980) Seasonal changes in low temperature resistance of grape buds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(4), 329-336.
- Quamme HA (1991) Application of thermal analysis to breeding fruit crops for increased cold hardiness. *HortScience* 26: 513-517.
- Quamme HA, Su WA, Veto LJ (1995) Anatomical features facilitating supercooling of the flower within the dormant peach flower bud. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:814–822.
- Rathgeber CB, Cuny HE & Fonti P (2016) Biological basis of tree-ring formation: a crash course. *Frontiers in plant science*, 7.
- Ravaz L. 1903. Sur la brunissure de la vigne. *Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 136:1276-1278.
- Renaud V, Rebetez M (2009) Comparison between open-site and below canopy climatic conditions in Switzerland during the exceptionally hot summer of 2003. *Agric For Meteorol* 149(5):873–880. doi:10.1016/j.agrformet.2008.11.006 *Int J Biometeorol*
- Robinson J (2006) *The Oxford companion to wine*, 3rd edn. Press, Oxford University
- Rubio S, Dantas D, Bressan-Smith R, Pérez F (2016) Relationship between endodormancy and cold hardiness in grapevine buds. *J Plant Growth Regul* 35(1):266–275. doi:10.1007/s00344-015-9531-8
- Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in botanical research* 49: 35-150.

- Saayman D (1983) Investigations into the Causes and Control of the Growth Arrestment Phenomenon of Sultana. I. Symptoms and Survey Results. S. Afr. J. Enol. Vitic, 4(1), 21.
- Sage R, Kubien D (2007) The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. Plant Cell Environ 30:1086–1106. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants. Ecological Studies 62. Springer-Verlag, Berlin
- Sakai A, Weiser C (1973) Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions. Ecology 54: 118-126
- Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM, Ashworth EN, Bordelon BP (1996) Programmed accumulation of LEA-like proteins during desiccation and cold acclimation of overwintering grape buds. Plant, Cell & Environment, 19(6), 713-720.
- Saxe H, Cannell MGR, Johnsen B, Ryan MG, Vourlitis G (2001) Tree and forest functioning in response to global warming. New Phytologist. 149:369-399.
- Schnabel BJ, Wampl RL (1987) Dormancy and cold hardiness in *Vitis vinifera* L. cv. White Riesling as influenced by photoperiod and temperature. Am. J. Enol. Vitic. 38:265-272.
- Shaulis N (1971) Vine hardiness a part of the problem of hardiness to cold in NY vineyards. In Proc. NY State Hortic. Soc Vol. 116:158-66.
- Solomon S (2007) Technical summary. Pages 19-91 Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change New York, Cambridge University Press.

- Stafne ET (2007) Factors affecting cold hardiness in grapevines. Res. Ext. Bull., Department of Horticulture and Landscape Architecture, Oklahoma State University, Stillwater, OK, 7 p. <http://www.grapes.okstate.edu/PDFs/HISColdHardyGrapes.pdf>
- Steffen K, Arora R, Palta J (1989) Relative sensitivity of photosynthesis and respiration to freeze-thaw stress in herbaceous species importance of realistic freeze-thaw protocols. Plant Physiol 89(4):1372–1379
- Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Annual Review of Plant Physiology, 35(1), 543-584.
- Stergios BG, Howell GS (1977) Effect of site on cold acclimation and deacclimation of Concord grapevines. Am. J. Enol. Vi- tic. 28:43-8.
- Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J,..., Midgley BM (2013) IPCC 2013: climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- Strik BC (1992) Assessing winter injury and pruning accordingly. In: Oregon Winegrape Growers' Guide. OWA, Portland. pp. 43-48.
- Stushnoff C, Remmele Jr RL, Esensee V, McNeil M (1993) Low temperatura induced biochemical mechanisms: implications for cold acclimation and de-acclimation. In: Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate (Vol.116) NATO ASI Series. M.B Jacson and CR Black (eds), pp647-657. Springer-Verlag.
- Tarara JM, Hoheisel GA (2007) Low-cost shielding to minimize radiation errors of temperature sensors in the field. Hortscience 42(6):1372–1379
- Thomas H, James AR (1993) Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought, Annual Botany in London, vol. 72 pp. 249–254

- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571–599
- Thompson K, Grime J, Mason G (1977) Seed germination in response to diurnal fluctuations of temperature. *Nature* 267(5607):147–149
- Van der Westhuizen JH, Saayman D, Knight F, Myburgh PA, Volschenk CG, Malan D, Burnett J, Steenkamp J (2000) Growth Arrestment Phenomenon and Dying Back in vineyards in the below orange river area. Wynboer Home, Wineland.
- Vitra A, Lenz A, Vitasse Y (2017) Frost hardening and dehardening potential in temperate trees from winter to budburst. *New Phytologist*. doi: [10.1111/nph.14698](https://doi.org/10.1111/nph.14698)
- Volschenk CG & Hunter JJ (2009) Dieback of young vine and the growth arrestment phenomenon along the Lower Orange River. Wynboer Thcnical Yearbook.
- Walton VM, Dreves AJ, Gent DH, James DG, Martin RR, Chambers U & Skinkis PA (2007) Relationship between rust mites *Calepitrimerus vitis* (Nalepa), bud mites *Colomerus vitis* (Pagenstecher)(Acari: Eriophyidae) and short shoots syndrome in Oregon vineyards. *International journal of acarology* 33(4), 307-318.
- Walton VM, Skinkis P, Dreves A, Kaiser C, Renquist S, Castagnolli S, & Hilton R (2009) Grapevine growth distortions: a guide to identifying symptoms. Corvallis, Or.: Extension Service, Oregon State University.
- Wample R, Wolf T (1996) Practical considerations that impact vine cold hardiness. In: Henick-Kling T, Wolf TE, Harkness EM (eds) *Proc. 4th Intl. Symp. Cool Climate Viticulture and Enology*. New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, pp 23–28
- Wample RL, Bary A (1992) Harvest date as a factor in carbohydrate storage and cold hardiness of Cabernet Sauvignon grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 32-36.

- Weiser CJ (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 169:1269-1278. DOI: [10.1126/science.169.3952.1269](https://doi.org/10.1126/science.169.3952.1269)
- Wermelinger B, Baumgärtner J, Gutierrez AP (1991) A demographic model of assimilation and allocation of carbon and nitrogen in grapevines. *Ecological Modelling*, 53, 1-26.
- Winkler AJ, Williams WO (1945) Starch and sugars of *Vitis vinifera*. *Plant physiology*, 20(3), 412.
- Wisniewski M, Wolf T, Fuchigami L (1996) Biochemical and biophysical mechanisms of cold hardiness in woody plants. In: Henick-Kling T, Wolf TE, Harkness EM (eds) *Proc. 4th Intl. Symp. Cool Climate Viticulture and Enology*. New York State Agricultural Experiment
- Wolf TK, Cook MK (1992) Seasonal deacclimation patterns of three grape cultivars at constant, warm temperature. *Am J Enol Vitic* 43: 171–179
- Wolf TK, Pool RM (1987) Factors affecting exotherm detection in the differential thermal analysis of grapevine dormant buds. *J Amer Soc Hort Sci* 112:520–525
- WRCC (2013) Western Regional Climate Center, Cooperative Climatological Data Summaries <http://www.wrcc.dri.edu/climatedata/climsum/>. Accessed 4 January 2017
- Yemm EW, Cocking EC (1955) The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *J. Biochem.* 57: 508-514.
- Yoshida S, Sakai A (1974) Phospholipid degradation in frozen plant cells associated with freezing injury. *Plant physiol.* Vol 53, 509-511.
- Yoshida S, Uemura M (1990) Responses of the plasma membrane to cold acclimation and freezing stress. In: Larsson, C. & Møller, I.M. (eds.). *The plant plasma membrane*. Berlin, Springer-Verlag. p. 293-319.

Zabadal TJ, Dami IE, Goffinet MC, Martinson T, Chien M (2007) Winter injury to grapevines and methods of protection. Mich State Univ Ext E2930:1–44.

doi:10.1016/j.cropro.2005.11.004

Zachariassen KE, Kristiansen E (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature.

Cryobiology, 41(4), 257-279.